

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



TESIS DOCTORAL

**Modelo de levadura humanizada mediante expresión de la proteína oncogénica
PI3K:
aplicación a la búsqueda de inhibidores y al estudio de la señalización lipídica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Teresa Fernández-Acero Bascones

Directores

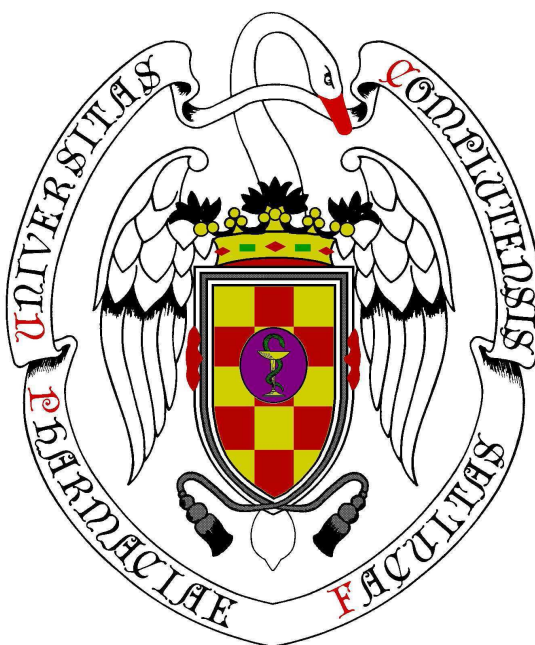
Víctor Jiménez Cid
María Molina Martín

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II



Modelo de levadura humanizada mediante
expresión de la proteína oncogénica PI3K:
aplicación a la búsqueda de inhibidores y al
estudio de la señalización lipídica

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por
TERESA FERNÁNDEZ-ACERO BASCONES

Directores
VÍCTOR JIMÉNEZ CID
MARÍA MOLINA MARTÍN
Madrid, 2014

D^a CONCEPCIÓN GIL GARCIA, Directora del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid CERTIFICA: Que TERESA FERNÁNDEZ-ACERO BASCONES ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores VÍCTOR JIMÉNEZ CID y MARIA MOLINA MARTÍN el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Modelo de levadura humanizada mediante expresión de la proteína oncogénica PI3K: aplicación a la búsqueda de inhibidores y al estudio de la señalización lipídica”

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2014

Fdo. Dra. D^a Concepción Gil García

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a:

-Beca Predoctoral del programa de Formación del Personal Universitario

(FPU) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Septiembre 2008 – Agosto 2012.

-Ayudas para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPU, concedidas para las estancias temporales en los laboratorios del Dr. Peter K. Vogt (*The Scripps Research Institute*, San Diego, CA, USA) en 2010 y del Dr. Wei Guo (*University of Pennsylvania*, Filadelfia, PA, USA) en 2011.

-El proyecto de investigación: “Análisis Funcional in vivo de la ruta oncogénica de mamíferos PI3K/PTEN/AKT mediante un sistema heterólogo de levadura” (2008-2011) subvencionado por la Fundación Mutua Madrileña.

-El proyecto de investigación: “*Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de la señalización eucariótica y su aplicación al diseño de bioensayos de cribado farmacológico” BIO2010-22369 (2010-2014) subvencionado por el Ministerio De Economía y Competitividad.

-Un contrato con cargo al proyecto de investigación: “Programación de circuitos microbianos en medicina protectiva y terapéutica” S2010/BMD-2414 subvencionado por la Comunidad de Madrid.

Abreviaturas

α : alfa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

BD: *binding domain*

BLAST: *basic local alignment search tool*

BSA: albúmina de suero bovino

cDNA: DNA complementario

CMAC: 7-amino-4-clorometilcumarina

CMI: concentración mínima inhibitoria

CORVET: *class C CORE Vacuole/Endosome Tethering*

cRNA: RNA complementario

Ct: ciclo umbral (*Cycle threshold*)

CWI: ruta de integridad celular (*Cell Wall Integrity pathway*)

DO: densidad óptica

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

DTT: ditionitrosito

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EE: endosoma temprano

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

FT: factor de transcripción

FM4-64: N-(3-trietilamonio)propil)-4-(p-dietilaminofenilhexatrienil) piridinio dibromuro

GAP: proteína activadora de GTPasa (*GTPase activating protein*)

GDP: guanosin difosfato

GEF: factor intercambiador de GTP (*Guanine nucleotide exchange factor*)

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

GPCR: receptor acoplado a proteínas G (*G protein coupled receptor*)

GTP: guanosín trifosfato

GTPasa: guanosina trifosfatasa

HOPS: *HOmotypic fusion and Protein Sorting*

IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosido

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LE: endosoma tardío

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MVB: cuerpos multivesiculares

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

°C: Grado centígrado

ONPG: orto-nitro fenil-b-D galactopiranosido

ORF: marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG: polietilenglicol

pH: potencial de Hidrógeno

PH: dominio de homología con pleckstrina (*pleckstrin homology*)

PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa (*Phosphatidyl inositol-3 kinase*)

PtdIns: fosfatidilinositol

PM: membrana plasmática (*plasma membrane*)

PMSF: p-metil sulfonil fluoruro

PSA: persulfato amónico

PVC: compartimento prevacuolar

qRT-PCR: cuantitativa en tiempo real

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

RE: endosoma de reciclaje

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: retrotranscripción inversa asociada a la cuantificación por PCR en tiempo real

SD: medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa

SG: medio sintético de crecimiento de levaduras con galactosa

SR: medio sintético de crecimiento de levaduras con rafinosa

SDS: dodecil sulfato sódico

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*

TAE: solución Tris-acetato EDTA

TE: solución Tris EDTA

TEMED: tetrametiletilediamina

TGN: trans-Golgi (*trans-Golgi network*)

TRAPPI o II: *transport protein particle I o II*

U: unidades de actividad enzimática

UV: ultravioleta

v/v: volumen en volumen

VPS : *vacuole protein sorting*

WT: cepa silvestre (*Wild type*)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

YPD: medio rico de crecimiento de levaduras (*Yeast extract peptone dextrose*)

ZL: Zimoliasa

ÍNDICE

SUMMARY	1
<i>Introduction</i>	3
<i>Objectives</i>	5
<i>Results and Discussion</i>	5
1. <i>Detection of extracts with PI3K inhibitory activity in a collection of natural extracts using a yeast bioassay</i>	5
2. <i>PtdIns-4,5P₂ deprivation alters vesicular trafficking</i>	7
3. <i>PI3K-induced PtdIns-4,5P₂ depletion triggers CWI activation</i>	7
4. <i>CWI upstream components assemble at recycling endosomes upon PtdIns-4,5P₂ depletion</i>	8
<i>Conclusions</i>	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Los fosfoinosítidos como segundos mensajeros en la célula eucariótica.....	15
2. Las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3Ks)	19
2.1. Generalidades	19
2.2. Estructura de las PI3K de Clase IA.....	21
2.3. Regulación y activación de las PI3K de Clase IA.....	22
2.4. Señalización mediada por la ruta PI3K/Akt.....	23
3. PI3K y enfermedad: alteraciones de la ruta implicadas en oncogénesis.....	25
4. Inhibidores de la ruta de señalización PI3K/Akt	30
4.1. Inhibidores duales de PI3K/mTOR	31
4.2. Inhibidores de PI3K	32
4.3. Inhibidores de Akt.....	34
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo en biomedicina y plataforma para el descubrimiento de fármacos	34
5.1. Expresión de genes heterólogos en <i>S. cerevisiae</i> : desarrollo de levaduras humanizadas para el estudio de genes implicados en patologías.....	37
5.2. Estrategias para la investigación con levaduras humanizadas	39
5.3. Levaduras humanizadas para el descubrimiento de moléculas con aplicación terapéutica en patologías humanas	41
6. Transducción de señales en <i>S. cerevisiae</i> : la ruta de integridad celular.....	43
6.1. La ruta de integridad celular (CWI)	43
7. Polaridad celular y citoesqueleto de actina en <i>S. cerevisiae</i>	48
8. Tráfico intracelular de membranas en <i>S. cerevisiae</i>	49
8.1. Endocitosis en <i>S. cerevisiae</i>	49

8.2. Ruta secretora	56
9. Funciones de los fosfolinosítidos en <i>S. cerevisiae</i>	58
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	65
1. Reconstrucción de la ruta oncogénica integrada por PI3K, PTEN y Akt (PKB) en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	67
2. Empleo del sistema de levadura humanizada mediante expresión heteróloga de PI3K como herramienta para el estudio de la función que desempeña el PtdIns-4,5P ₂ en <i>S. cerevisiae</i>	68
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Microorganismos utilizados	73
2. Medios de cultivo de microorganismos y condiciones de crecimiento	74
3. Técnicas de biología molecular.	74
4. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas	79
5. Ensayos de recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs)	81
6. Ensayos de inhibición en medio líquido	81
7. Ensayos de inhibición de halo reverso en medio sólido	82
8. Rastreo de inhibidores de PI3K	82
9. Análisis transcripcional mediante <i>microarrays</i> de DNA	84
10. Detección de proteínas mediante <i>Western-blotting</i>	87
11. Ensayos β -galactosidasa	89
12. Microscopía de fluorescencia	90
13. Rastreo a gran escala sobre la colección de mutantes delecionados en genes no esenciales de levadura	91
RESULTADOS	95
1. Optimización de un bioensayo en levadura para la búsqueda de inhibidores específicos de PI3K de clase I	97
1.1. Inhibidores de PI3K contrarrestan la inhibición del crecimiento causado por la expresión heteróloga de esta proteína	97
1.2. La deleción del gen que codifica para el transportador de membrana Snq2 incrementa la sensibilidad del ensayo de inhibición de PI3K en levadura	100
1.3. El empleo de bajas concentraciones del detergente SDS favorece la eficiencia del ensayo de inhibición de PI3K en levadura	101
1.4. Validación del bioensayo optimizado con inhibidores conocidos de PI3K	102
1.5. La realización de ensayos de inhibición en el mutante <i>vip1Δ</i> permite el análisis de inhibidores de Akt en levaduras	107

1.6. Utilización del bioensayo de PI3K en levadura en un rastreo piloto de búsqueda de inhibidores en extractos de origen microbiano	109
2. Estudios de relación estructura-actividad de la subunidad catalítica p110 α en el modelo de levadura.	114
2.1. Análisis funcional del dominio de unión a Ras (RBD) y del dominio C2 de la subunidad catalítica p110 α en levadura.....	114
2.2. La introducción de una señal N-terminal de miristoilación en p110 α ocasiona la inhibición del crecimiento de la levadura.....	117
3. Caracterización de los efectos de la conversión de PtdIns-4,5P ₂ en en PtdIns-3,4,5P ₃ en <i>S. cerevisiae</i>	119
3.1. La expresión de PI3K reduce la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i>	119
3.2. La pérdida de polaridad del citoesqueleto de actina inducida por la expresión de PI3K se correlaciona con la disminución de los niveles de PtdIns-4,5P ₂ en la membrana plasmática	119
3.3. La expresión de PI3K retarda el transporte endocítico de FM4-64 a la vacuola y altera la localización de la proteína Snc1.....	121
3.4. La expresión de PI3K produce defectos en la morfología vacuolar	124
3.5. La falta de PtdIns-4,5P ₂ altera la morfología del trans-Golgi (TGN).....	126
3.6. La localización de los componentes del exocisto Exo70, Exo84, Sec6, Sec5 y Sec3 se encuentra alterada en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P ₂	127
3.7. La falta de PtdIns-4,5P ₂ inducida por expresión de PI3K causa la activación de la ruta CWI de <i>S. cerevisiae</i>	129
3.8. La expresión de PI3K altera la localización de Pkc1 y provoca su aparición en endosomas de reciclaje.....	144
3.9. El tratamiento con el inhibidor 15e de PI3K revierte los efectos causados por la expresión de PI3K en levadura.....	157
3.10. Rastreo genómico de procesos regulados por PtdIns-4,5P ₂ en la célula de levadura.	160
DISCUSIÓN.....	171
Detección de extractos de origen microbiano con actividad inhibidora sobre PI3K en un bioensayo en levadura	173
Estudio funcional de los dominios C2 y RBD de PI3K (p110 α) en el sistema de levadura humanizada.....	178
Repercusión de la eliminación de PtdIns-4,5P ₂ en el tráfico vesicular	181
La falta de PtdIns-4,5P ₂ desencadena una activación persistente de la ruta CWI.....	183

La activación de la ruta CWI en ausencia de PtdIns-4,5P ₂ se produce desde endosomas de reciclaje	189
CONCLUSIONES.....	197
BIBLIOGRAFÍA.....	203

SUMMARY

Introduction

Class I Phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K) are mammalian proteins that catalyze the conversion of PtdIns-4,5P₂ into PtdIns-3,4,5P₃ at the plasma membrane. The latter is a second messenger that recruits protein kinase B, Akt, which in turn activates a large number of downstream effectors. The negative regulator of this pathway, the phosphatase PTEN, dephosphorylates PtdIns-3,4,5P₃ giving rise to PtdIns-4,5P₂. This pathway favours cell proliferation and inhibits apoptosis, among other functions, and its abnormal hyperactivation leads to tumorigenesis.

We have generated a humanized yeast system by expressing the main elements of this pathway in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*, which constitutively lacks of them. While the expression of the wild type catalytic subunit of PI3K, p110 α , does not affect yeast growth, expression of hyperactive versions, like the oncogenic mutant p110 α ^{H1047R} or a plasma membrane directed form, p110 α -CAAX, leads to the growth inhibition of the yeast cell due to the depletion of essential pools of PtdIns-4,5P₂ (Rodríguez-Escudero, *et al.* 2005). The phosphatase PTEN is able to counteract this effect (Andrés-Pons *et al.* 2007). In addition, the co-expression of wild type p110 α with Akt, relocalizes Akt from the cytoplasm to the plasma membrane, causing as well growth inhibition by an Akt kinase-dependent mechanism (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009). Therefore, PI3K effects in yeast can be used to screen for PI3K/Akt inhibitors, as well as for genetic functional studies in search of mutations that may alter PI3K-derived phenotype in yeast.

On the other hand, this model is also very useful for basic research purposes such as exploring the roles of PtdIns-4,5P₂ in yeast cells. PtdIns-4,5P₂ is synthesised at the plasma membrane by the essential PtdIns-4P 5-kinase Mss4 (*Multicopy Suppressor of Stt4*) (Desrivieres *et al.*, 1998). Genetic studies on a thermosensitive version of Mss4 have established the involvement of this lipid in the regulation of the actin cytoskeleton (Desrivieres *et al.*, 1998; Homma *et al.*, 1998; Audhya *et al.*, 2000; Audhya *et al.*, 2004), in clathrin-mediated endocytosis, interaction with several endocytic patch adaptors (Aguilar *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005), and as a cell polarity marker, directing the attachment of exocyst components Exo70 and Sec3 to the plasma membrane (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Our previous work showed that heterologous expression of

PI3K (p110 α -CAAX) causes loss of the actin cytoskeleton polarity at the growing bud and of the septin ring at the mother-bud barrier, alterations in endocytic transport and an increased phosphorylation of the cell wall integrity pathway (CWI) MAPK Slt2 (Rodriguez-Escudero *et al.*, 2005). This pathway is activated in response to cell wall damage and leads to the transcriptional regulation of genes involved in cell wall remodelling (Levin, 2011). Activation takes place at polarized growth sites where the localized synthesis of new cell wall is important for cell expansion and growth. The stress is sensed by a family of transmembrane receptors [Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 and Mtl1 (Jendretzki *et al.*, 2011)] which transmit the stimulation signal to the GTPase GEFs (*GDP/GTP Exchange factors*) Rom1/2 (Philip and Levin, 2001). These proteins promote the activation of the small GTPase Rho1 which in turn regulates several effectors to drive different cellular functions. One of them is protein kinase C1 (Pkc1), which activates the CWI MAPK cascade (Kamada *et al.*, 1996). The MAPK at the end of this pathway, Slt2, activates the transcription factor Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995) and the dimeric complex SBF (Swi4/6) (Madden *et al.*, 1997).

In this work, we take advantage of PI3K-dependent cell growth defects in yeast to evaluate performance of competitive PI3K inhibitors in an *in vivo* experimental setting. To demonstrate that such bioassay provides a platform readily scalable to screen for novel PI3K inhibitors, we set up its application to high-throughput screening (HTS) by performing a pilot screen on a collection of extracts of microbial origin. In addition to this application, our system provides a tool to study in depth how PtdIns-4,5P₂ regulates the CWI pathway as well as other yeast cellular processes. We have shown that PI3K-induced PtdIns-4,5P₂ depletion activates CWI and generates a transcriptional profile reminiscent of cell wall damages. In parallel, we observed several endocytic trafficking alterations and the re-location of the upstream CWI components to cytoplasmic compartments that are coincident with recycling endosomes. We propose that upstream CWI components Wsc1, Rho1 and Pkc1 are assembled in these compartments upon PtdIns-4,5P₂ loss and are able to transmit the activation signal, downstream CWI components upstream the MAPK cascade.

Objectives

1. Application of the PI3K (p110 α)- and Akt- expressing humanized yeast as a bioassay for detection of inhibitory compounds.
 - 1.1. Bioassay validation and optimization with known/commercial PI3K (p110 α) and Akt inhibitors.
 - 1.2. Pilot HTS on microbial extracts on search for new PI3K (p110 α) inhibitory molecules.
2. Structure-activity studies on PI3K (p110 α) catalytic subunit by site-directed mutagenesis in the yeast system.
3. Use of a humanized yeast system expressing PI3K as a research tool to study PtdIns-4,5P₂ function in *S. cerevisiae*.
 - 3.1. Endocytosis and intracellular trafficking alterations.
 - 3.2. CWI activation.
 - 3.3. Transcriptomic studies and genomic screening.

Results and Discussion

1. Detection of PI3K inhibitory activity in a collection of natural extracts using a yeast bioassay

In this work we have developed a yeast bioassay based on the growth inhibition caused by heterologous expression of a plasma membrane directed version of PI3K, p110 α -CAAX, from its optimization with five commercial PI3K inhibitors, to the settling of the best conditions for its systematization. First, we have determined that the best detected growth recovery upon PI3K inhibition is achieved in yeast expressing highly toxic versions, like p110 α -CAAX. Second, we found an increase in assay sensitivity by adding small concentrations of the detergent SDS (0.003%) to the culture media and using a mutant strain lacking the detoxification pump Snq2, as strategies aimed to rise intracellular concentrations of the compounds tested. Third, we determined that the realization of PI3K inhibition assays in liquid media, rather than on solid media, was appropriate for large scale analyse. However, the latter is more simple, fast, visual and easy to interpret while assaying individual PI3K inhibitors. Besides we have set up the yeast model for the detection of Akt inhibitors by using a mutant strain defective in inositol polyphosphate synthesis, *vip1 Δ* , which enhances growth inhibition upon co-

expression of p110 α with Akt. However, Akt inhibitors rescued yeast growth to a lower extent than PI3K inhibitors, probably due to the similarity of Akt with other AGC kinases which might be unspecifically inhibited.

Our optimized bioassay has proved to be robust and suitable to detect activity against PI3K in a microbial extract library. Natural products are a source of new chemical structures and molecules. In fact, we detected 55 extracts with PI3K inhibitory activity over a collection of 9600, which are currently being studied in cell culture and *in vitro* assays. In comparison with other assay strategies, such as *in vitro* enzymatic assays and High Content Screening (HCS) that require expensive reagents and/or complex systems to detect the inhibition, our yeast-based assay is economic, easy to perform and to interpret. Since inhibition is indeed carried out in an *in vivo* environment, our assay directly discards toxic candidates, selecting inhibitors that selectively and specifically block PI3K activity. Therefore our bioassay could be used as a primary screening system in order to select p110 α inhibitory candidates for further validation in higher eukaryotic models and *in vitro* assays.

Moreover, PI3K-dependent yeast growth inhibition allowed us to perform functional studies on p110 α C2 and Ras-binding domains. By site directed mutagenesis, we mutated to alanine residues Lys410, Arg412, Lys413, and Lys416 in p110 α C2 domain, which seem to be involved in plasma membrane binding through electrostatic interactions (Huang *et al.*, 2008). We observed a decrease in both growth inhibition and Akt phosphorylation in cells expressing the mutant versions. It was described that mutation of Lys227 in the RBD to glutamic abolishes p110 α -Ras interaction, which is important for full PI3K activation (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996). To check whether the interaction between p110 α and yeast orthologues of mammalian Ras, Ras1/2, was also crucial for p110 α function in yeast, we introduced this mutation, but it did neither alter growth inhibition nor Akt phosphorylation. These results mean that in the absence of an artificial plasma membrane targeting signal, p110 α interacts with plasma membrane through the aforementioned C2 residues. On the other hand, p110 α -Ras interaction is dispensable for p110 α function in yeast. Additionally, we generated an N-myristoylated p110 α version, Myr-p110 α , which caused a mild growth inhibition when expressed in yeast. These results highlight the importance of p110 α plasma membrane recruitment for its function, as described in higher eukaryotes (Hu *et al.*, 1995; Klippel *et al.*, 1996).

2. PtdIns-4,5P₂ deprivation alters vesicular trafficking

By fluorescence microscopy, we followed the endocytic process upon p110 α -CAAX expression and described internalization defects of endosomal fluorescent marker FM4-64 (Vida and Emr, 1995) and of the protein Snc1 (Lewis *et al.*, 2000), whose presence at the plasma membrane is notably enhanced in comparison to control cells. Moreover, we reported alterations in vacuolar morphology, with three different vacuolar staining markers, as well as *trans*-Golgi (TGN) fragmentation. Thus, PtdIns-4,5P₂ elimination causes severe intracellular trafficking disruption.

3. PI3K-induced PtdIns-4,5P₂ depletion triggers CWI activation

We have proved that PtdIns-4,5P₂ elimination causes a persistent phosphorylation of the CWI MAPK, Slt2, as well as up-regulation of transcriptional reporters of this pathway such as its main transcription factor Rlm1 (Garcia *et al.*, 2004b), leading to activation of the *MLP1* promoter (Rodriguez-Pena *et al.*, 2008). These results are consistent with the transcriptional profile obtained by DNA microarray analysis of p110 α -CAAX expressing cells, which is reminiscent to the one obtained upon cell wall damages and fairly coincident with the transcriptional fingerprint of CWI activation. The elements involved in transmission of the signal through this pathway are Wsc1, Rom2, Rho1 and Pkc1, but the hyperactivation of the MAPK module does not seem to be responsible for PI3K-dependent growth inhibition. Furthermore, we performed a genomic screening on the whole genome deletion mutant collection for Myr-p110 α phenotypic suppression or enhancement, and found, that the deletion of *WSC1* or *ROM2*, among many others, suppressed Myr-p110 α -induced toxicity, which confirmed that Wsc1 and Rom2 are modulators of PI3K lethality and PtdIns-4,5P₂-dependent signalling.

On the other side we have shown that PtdIns-4,5P₂ loss at the plasma membrane (Yu *et al.*, 2004), provokes depolarization of the actin cytoskeleton in p110 α -CAAX-expressing yeasts. This was not surprising given that PtdIns-4,5P₂ is known to regulate actin cytoskeleton function (Saarikangas *et al.*, 2010) and behaves as a marker for polarized secretion, driving the attachment of the exocyst to the plasma membrane (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Actually, we observed attachment defects of several exocyst components to the plasma membrane in these conditions, similar to those previously described for a mutant version of the exocyst subunit Sec3 unable to interact with this

phosphoinositide (Baek *et al.*, 2010). It has been described that, upon thermic stress, yeast cells depolarized growth and activates the CWI MAPK cascade, in a manner dependent on the upstream CWI components Wsc1-Rom2-Rho1-Pkc1, in order to repolarize actin cytoskeleton and to adapt to the stress (Delley and Hall, 1999). We propose that Wsc1-Rom2-Rho1-Pkc1 sense PtdIns-4,5P₂ elimination and respond to this signal by both depolarizing the actin cytoskeleton and activating MAPK signalling. However, persistent activation of this pathway is not able to repolarize growth in the absence of PtdIns-4,5P₂ turnover because actin cytoskeleton function is compromised. In line with this, in our genomic screen we found that *SRV2* was a strong suppressor of Myr-p110 α growth inhibition. It has been proved that defects in actin cable and polarized secretion can be suppressed by mutations in genes that favour actin disassembly, like *SRV2* (Chaudhry *et al.*, 2013), because these mutations partially reduce actin depolymerization.

4. CWI upstream components assemble at recycling endosomes upon PtdIns-4,5P₂ depletion

In PI3K expressing cells, Pkc1 is neither located in polarized growth sites nor at the plasma membrane, as described for cell wall stimulation conditions. Instead, it is found at intracellular compartments, which co-localize with the endosomal marker FM4-64, the Rab GTPases Ypt31/32 and the protein Snc1, in an actin-dependent way. These GTPases regulate exit and exocytosis of cargoes from TGN as well as recycling of proteins from early endosomes, such as the protein Snc1, through its effector Rcy1, (Jedd *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2005; Lipatova *et al.*, 2008). It is therefore interesting that the absence of *RCY1* enhances growth inhibition of Myr-p110 α , meaning that this process may contribute to cell survival. Interestingly, such Pkc1 location is coincident with that of CWI upstream components Wsc1 and Rho1, which suggest that they are active in these compartments. Both Pkc1 location and MAPK activation are indeed a consequence of PI3K activity, since the treatment with PI3K inhibitor 15e abolishes these effects.

The results obtained in this work support the role of PtdIns-4,5P₂ as a plasma membrane identity marker in trafficking events, such as endocytosis or exocytosis. We propose that CWI module comprising Wsc1-Rom2-Rho1-Pkc1 sense the lack of this molecule, and, as a consequence, provoke actin cytoskeleton depolarization and MAPK activation. The

former would alter endocytic and exocytic transport, thus resulting in trafficking defects, such as the accumulation of recycling endosomes containing Ypt31/32, Snc1, Wsc1, Rho1 and Pkc1. Activation of Pkc1 at these compartments would still be able to signal to downstream components in the cascade, perhaps in order to promote cell survival. We speculate that CWI is activated from recycling endosomes upon persistent PtdIns-4,5P₂ elimination.

Conclusions

1. The use of the mutant strain *snq2Δ* and the presence of 0.003% of the detergent SDS optimize PI3K inhibition bioassay in *S. cerevisiae*, based on recovery of the toxicity caused by p110α-CAAX expression.
2. Among the five commercial inhibitors evaluated, 15e and PI-103 were the most potent in this bioassay.
3. A *vip1Δ* mutant strain co-expressing p110α with Akt1 must be used to allow the detection of Akt inhibitors in the yeast bioassay.
4. Quality, reproducibility and robustness of PI3K inhibition bioassay for large scale screening were proved by the identification of 55 microbial extracts among 9600 screened in a pilot high-throughput screening (HTS).
5. Residues Lys410, Arg412, Lys413, and Lys416 in p110α C2 domain are necessary for growth inhibition in yeast, being the Ras Binding Domain dispensable for this effect.
6. Addition of an N-myristoylation signal to p110α causes mild yeast growth inhibition, compared to the one achieved by p110α-CAAX.
7. p110α-CAAX-dependent PtdIns-4,5P₂ elimination causes loss of the actin cytoskeleton polarity, exocyst plasma membrane attachment defects, intracellular endocytic traffic delay and vacuolar and TGN morphology alterations.
8. Lack of PtdIns-4,5P₂ provokes a persistent CWI activation, dependent on the receptor Wsc1, the GEF Rom2, the GTPase Rho1 and protein kinase Pkc1, and generates a transcriptional profile consistent with this stimulation.
9. In these conditions Pkc1 co-localizes with Wsc1 and Rho1, Rab GTPases Ypt31/32 and Snc1 at recycling endosomes, in an actin dependent way.
10. CWI activation and Pkc1 location are consequence of p110α-CAAX catalytic activity, as they are reduced upon treatment with PI3K inhibitor 15e.

11. Myr-p110 α -induced partial growth inhibition is enhanced in mutants lacking genes related to translation and Golgi components, and is alleviated in mutants lacking genes related to RNA processing and CWI components.

INTRODUCCIÓN

[illegible]

15

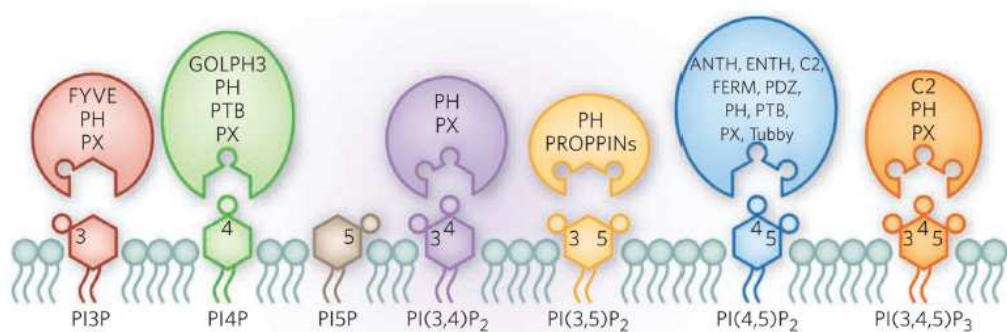


Fig.2. Módulos o dominios de proteínas que interaccionan con fosfoinosítidos. La figura muestra los distintos dominios de interacción con fosfoinosítidos presentes en determinadas proteínas (FYVE, *Fab1*, *YOTB*, *Vac1* and *EEA1*; PH, *Pleckstrin Homology*; PX, *Phox homology*; GOLPH3, *Golgi phosphoprotein 3*; PTB, *phosphotyrosine binding*; PROPPINs, *β -propellers that bind PIs*; ANTH, *AP180 N-terminal homology*; ENTH, *epsin N-terminal homology*; C2, *conserved region-2 of protein kinase C*; FERM, *4.1, ezrin, radixin, moiesin*; PDZ, *postsynaptic density 95, disk large, zonula occludens*) y la especie de fosfoinosítido a la que se unen. Tomado de Kutateladze (2010).

Los fosfoinosítidos, a diferencia de los lípidos estructurales, se presentan en pequeñas cantidades en la célula, lo cual denota un papel más importante en señalización que meramente estructural. Cada uno de ellos presenta una distribución subcelular particular que confiere identidad a un orgánulo en concreto y así permite que los procesos de tráfico y transmisión de señales se ejecuten de manera específica en estos lugares, razón por la cual desempeñan un papel esencial para la célula eucariótica. La conversión entre las distintas especies se lleva a cabo por quinasas y fosfatasas específicas (Figura 1), que actúan regulando de manera precisa los niveles de estos mensajeros para la homeostasis celular, y cuya localización está a su vez controlada con este propósito (McCrea y De Camilli, 2009). Los fosfoinosítidos interaccionan con sus efectores principalmente a través de módulos de aminoácidos básicos que confieren una carga electrostática positiva a estos últimos que facilita la unión a los primeros, cargados negativamente. Estos módulos o dominios se encuentran en numerosas proteínas y reciben un nombre dependiendo de sus características y su especificidad por el fosfoinosítido (Figura 2) (Lemmon, 2008; Moravcevic *et al.*, 2012).

El primer módulo de interacción con fosfoinosítidos que se identificó fue el dominio PH (*Pleckstrin homology*), cuya interacción con PtdIns 4,5-P₂ fue descrita por Harlan *et al.* (1994). Sin embargo la afinidad de este módulo por un fosfoinosítido en particular es

variable dependiendo de la proteína en la que se encuentre (Lemmon, 2008). Actualmente se conocen 11 módulos que interaccionan con fosfoinosítidos con una afinidad variable (Figura 2). El reconocimiento del fosfoinosítido por parte de una proteína en cuestión es un proceso complejo, que no siempre resulta específico, lo cual implica en algunos casos la interacción cooperativa entre varios dominios de la misma proteína para incrementar la avidéz de la interacción, o la interacción de un mismo módulo con dos fosfoinosítidos al mismo tiempo si ambos están presentes en la misma membrana (Kutateladze, 2010).

Entre las funciones desempeñadas de forma general por los fosfoinosítidos en la célula eucariótica destacan las siguientes:

-Señalización: existen numerosos ejemplos de procesos celulares en los que los fosfoinosítidos actúan como mediadores en las cascadas de señalización. El ejemplo más claro y relevante a este nivel es el ejercido por el PtdIns-3,4,5P_3 , sintetizado por las PI3K de Clase I a partir del PtdIns-4,5P_2 (Figura 1). Este fosfoinosítido se presenta en cantidades indetectables en condiciones normales en células de mamífero; sin embargo, en presencia de un estímulo que active la PI3K de Clase I, los niveles se incrementan notablemente desencadenando la activación de la ruta PI3K/Akt. El PtdIns-4,5P_2 también es el precursor de otros importantes segundos mensajeros, como por ejemplo el Ins-1,4,5P_3 y el diacilglicerol (DAG) (Figura 1) a través de la reacción catalizada por la fosfolipasa C (PLC) (Delage *et al.*, 2012), los cuales regulan respectivamente la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C.

-Regulación de GTPasas pequeñas: Un gran grupo de proteínas reguladas por los fosfoinosítidos son las pertenecientes a la superfamilia Ras de GTPasas de pequeño tamaño. La superfamilia Ras se divide en cinco familias: Ras, Rab, Ran, Rho y Arf, cada una de las cuales participa en un proceso celular concreto. La familia Ras regula la proliferación y la migración; la familia Ran la función del poro nuclear; las familias Rab y Arf el tráfico vesicular; y la familia Rho la función del citoesqueleto. Estas proteínas desempeñan su función en membranas celulares, a las cuales se anclan covalentemente. Las GTPasas pequeñas funcionan como interruptores moleculares que ciclan entre un estado inactivo unido a GDP y uno activo unido a GTP, a través del que regulan a sus efectores. Su actividad está regulada por dos tipos de proteínas: GAPs (*GTPase*

Activating Proteins) que estimulan la actividad GTPasa, y GEFs (*Guanine-nucleotide-Exchange Factors*), que promueven el intercambio de GDP por GTP, y por tanto favorecen su estado activo (Shewan *et al.*, 2011). Una característica común a las GAPs y GEFs es que suelen presentar dominios de unión a fosfoinosítidos; además, numerosas enzimas que metabolizan los fosfoinosítidos, son precisamente efectores de las GTPasas. En su estado activo unidas a GTP, las GTPasas pueden cooperar con los fosfoinosítidos en el reclutamiento de efectores a las membranas donde ambos están presentes de manera coincidente. De esta forma, la actividad de las GTPasas está indirectamente regulada espacio-temporalmente por los fosfoinosítidos y la presencia de una determinada especie de fosfoinosítido está también influenciada por dichas proteínas (Di Paolo *et al.*, 2006; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012).

- **Regulación del citoesqueleto de actina:** los fosfoinosítidos participan a diversos niveles en la regulación del citoesqueleto de actina. Existen numerosas proteínas con dominios de interacción específicos con fosfoinosítidos, especialmente con PtdIns-4,5P₂, que están implicadas en la nucleación y filamentación de la actina, principalmente en la membrana plasmática. Éste fosfoinosítido se sintetiza a partir de la fosforilación del PtdIns-5P o PtdIns-4P por las quinasas PI5P4K y PI4P5K, siendo la ruta mayoritaria de síntesis la que cataliza la PI4P5K a partir del PtdIns-4P (Figura 1). Ejemplos de estas proteínas son: el regulador del complejo Arp2/3 WASP (Rohatgi *et al.*, 2000); las cofilinas, que son los factores despolimerizadores de actina, y que están reguladas negativamente por PtdIns-4,5P₂ (Lassing y Lindberg, 1985); y la profilina, que regula negativamente la polimerización de actina, y también resulta inhibida a través de la interacción con este fosfoinosítido (Lassing y Lindberg, 1988). Además, existen otras proteínas con módulos de interacción con PtdIns-4,5P₂ que regulan la dinámica del citoesqueleto. Es característica la presencia de los dominios ENTH/ANTH, dos tipos de módulos estructuralmente similares que presentan afinidad por fosfoinosítidos, en proteínas implicadas en la endocitosis mediada por clatrina (Itoh y De Camilli, 2006). Por otro lado, los fosfoinosítidos regulan la actividad de proteínas Rho, las cuales son a su vez esenciales en el control del citoesqueleto y de la polaridad celular. A través de todas estas interacciones los fosfoinosítidos participan indirectamente en procesos celulares esenciales en los que está implicado el citoesqueleto de actina, como la endocitosis, motilidad celular, la citoquinesis y el establecimiento de polaridad celular (Saarikangas *et al.*, 2010).

- **Control e identidad del tráfico intracelular de membranas:** la distribución espacial específica de fosfoinosítidos permite el mantenimiento de la identidad de los distintos compartimentos celulares y la ejecución de sus funciones a través del reclutamiento de factores que reconocen inequívocamente estos mediadores. Por ejemplo, el PtdIns-3P se concentra en los orgánulos de la ruta endocítica temprana, en fagosomas y en autofagosomas; el PtdIns-3,5P₂ regula el tráfico en los endosomas tardíos y en la vacuola/lisosoma; el PtdIns-4P regula la secreción en el aparato de Golgi, aunque también está presente en la membrana plasmática; y el PtdIns-4,5P₂ ejecuta sus acciones principalmente a nivel de la membrana plasmática. De hecho, se ha descrito que este fosfoinosítido forma parte de microdominios, como por ejemplo los “*lipid rafts*”, que son dominios lipídicos que actúan como plataformas de señalización al concentrar sustratos y enzimas en el mismo entorno (McLaughlin y Murray, 2005; Johnson y Rodgers, 2008; Johnson *et al.*, 2008). En estos lugares es donde se piensa que, a través de la concentración de diferentes moléculas y mediadores, se favorece la polimerización de actina y la activación de distintas rutas de señalización (Laux *et al.*, 2000).

En cada compartimento los correspondientes mediadores lipídicos se asocian a efectores con los cuales interactúan a través de dominios específicos para regular el tráfico de vesículas y membranas (Mayinger, 2012 ; Delage *et al.*, 2013).

- **Otras funciones:** los fosfoinosítidos también participan en otras funciones particulares. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de PtdIns-4,5P₂ en el núcleo, donde parece regular el procesamiento del RNA (Barlow *et al.*, 2010; Keune *et al.*, 2011). También se ha relacionado a esta molécula con la regulación de proteínas transmembranales, ejerciendo un papel como cofactor de algunos canales de iones y transportadores (Suh y Hille, 2008; Rohacs, 2009).

2. Las fosfatidilinositol 3-quinisas (PI3Ks)

2.1. Generalidades

Las fosfatidilinositol 3-quinisas (PI3Ks) son proteínas que fosforilan el anillo de inositol de los fosfatidilinositoles (PtdIns) en posición 3', dando lugar a segundos mensajeros implicados en la regulación de funciones esenciales para la célula eucariótica como la

mitosis, crecimiento, supervivencia y migración celular, tráfico vesicular, metabolismo y organización del citoesqueleto, entre otras. Por ello, presentan un papel central en el desarrollo de patologías en mamíferos, como en cáncer (Braccini *et al.*, 2012; Zhu y Nelson, 2012; Dalton, 2013; Gambardella y Vermeren, 2013).

Esta gran familia se agrupa en tres clases en función de sus características estructurales, de la especificidad por su sustrato *in vitro* y de su distribución tisular. La Clase I puede fosforilar PtdIns-4P y PtdIns-4,5P₂ *in vitro* dando lugar a PtdIns-3,4P₂ y a PtdIns-3,4,5P₃, (Figura 1) pero presenta afinidad sólo por el último *in vivo* (Cantley, 2002). Las PI3Ks de Clase I han sido las más estudiadas y mejor caracterizadas hasta el momento. Son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 110 KDa, p110α/p110δ/p110β/p110γ, que es la responsable de sintetizar PtdIns-3,4,5P₃ *in vivo*, y otra adaptadora. Se pueden dividir en subclases IA (p110α, p110β y p110δ) y IB (p110γ) en función de la subunidad regulatoria con la que se asocian. Las primeras se asocian con subunidades regulatorias del tipo p85, de las cuales existen cinco variantes (Tabla 1). Se estimulan en respuesta a receptores con actividad tirosín-quinasa (RTK), salvo la isoforma p110β, que también puede hacerlo por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (*G Protein-Coupled Receptors*; GPCRs) (Kurosu *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 1999; Guillermet-Guibert *et al.*, 2008). La subclase IB, constituida exclusivamente por la subunidad p110γ, se asocia con las subunidades regulatorias p101 o p84 y se estimula por GPCRs (Metjian *et al.*, 1999).

Las PI3Ks de Clase II emplean como sustrato el PtdIns-4P *in vitro* (Figura 1). Carecen de subunidad reguladora y están constituidas por una sola subunidad catalítica de gran tamaño que se caracteriza por presentar un dominio carboxilo terminal C2 de unión a lípidos (Falasca y Maffucci, 2007). Son estimuladas por diversos mediadores extracelulares como citoquinas, por ejemplo TNFα, o insulina, entre otros (Ktori *et al.*, 2003).

Las de Clase III fosforilan el PtdIns para dar lugar a PtdIns-3P. El único miembro de esta clase es Vps34, que regula el tráfico vesicular y se encuentra de forma general en todos los organismos eucarióticos (Yan y Backer, 2007). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* sólo cuenta con un único representante de la familia de las PI3K, que es precisamente Vps34.

Tabla 1. Clasificación de las PI3Ks de Clase I, las distintas isoformas que comprenden, los receptores que estimulan su actividad y la distribución tisular que presentan.

Clase	Subunidad regulatoria	Subunidad catalítica	Receptor	Distribución tisular
IA	p85 (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ)	p110 α	RTK	Ubicua
		p110 β	RTK, GPCR	Ubicua
		p110 δ	RTK	Leucocitos
IB	p101, p84	p110 γ	GPCR	Leucocitos

Existe una cuarta clase de proteínas relacionadas con la familia PI3K (PIKK, *PI3K related kinase*) (Lempiainen y Halazonetis, 2009), en la cual se incluyen proteínas quinasas que presentan un centro catalítico similar al resto de los miembros de la superfamilia pese a que no fosforilan sustratos fosfoinosítidicos sino proteicos; regulan la transducción de señales, como mTor (*Target of Rapamycin*), o la respuesta al daño de DNA, como ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*).

2.2. Estructura de las PI3K de Clase IA

La estructura básica de la subunidad catalítica p110 de las PI3K de Clase IA consta de un dominio de unión a la subunidad reguladora o adaptadora (ABD), un dominio de unión al producto del oncogen H-Ras (RBD), un dominio C2 de unión a los lípidos de la membrana, un dominio helicoidal y un dominio quinasa (Figura 2). Al igual que todas las quinasas, contienen un bolsillo de unión a ATP y un sitio de unión a sustrato, que es similar entre los miembros de la familia de proteínas quinasas (Scheeff y Bourne, 2005). Las subunidades regulatorias son responsables de la inhibición de la actividad basal de la subunidad catalítica, la estabilización del heterodímero, la localización y la activación en condiciones de estimulación de la subunidad catalítica (Yu *et al.*, 1998; Luo y Cantley, 2005). Presentan un dominio N-terminal SH3 (*Src homology 3*), un dominio “BH” de homología con la Rho GAP (*GTPase activating protein*) del producto del gen *BCR*, y dos dominios SH2 (*Src homology 2*) (nSH2 y cSH2) que flanquean una región intermedia denominada iSH2 (Vadas *et al.*, 2011).

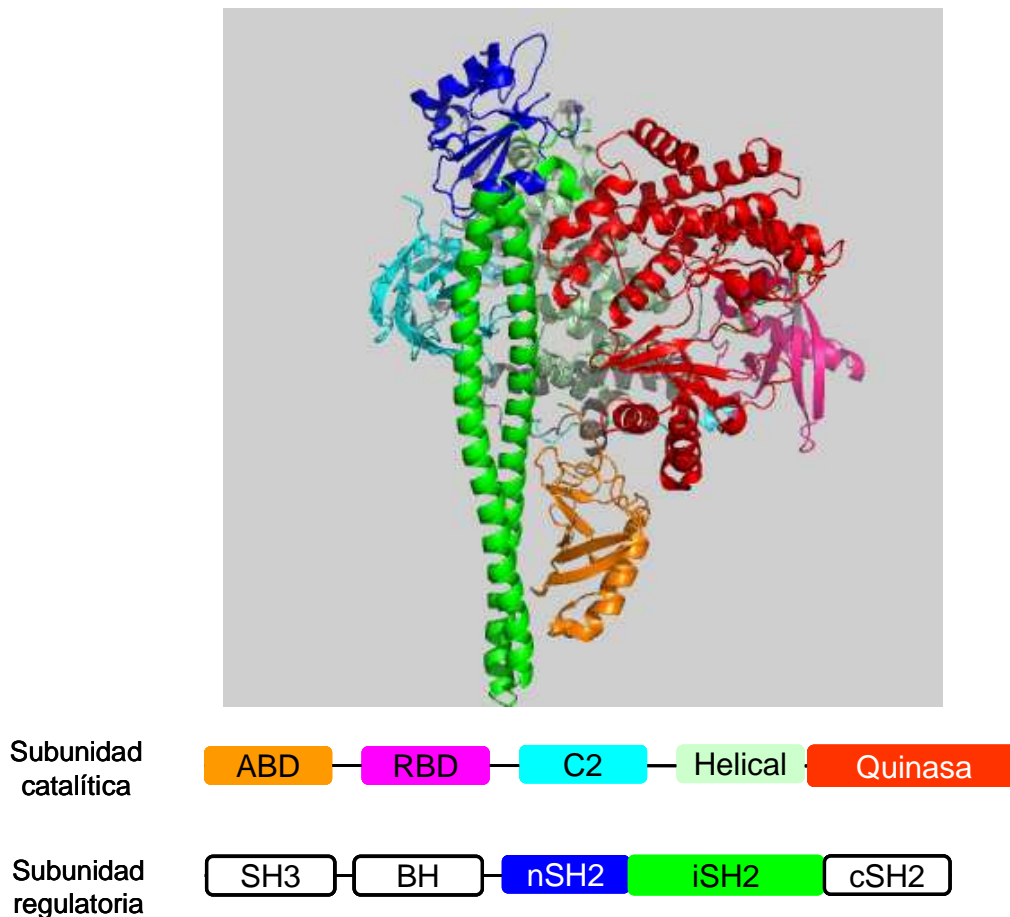


Fig.3. Representación esquemática de la estructura de las subunidades catalítica y regulatoria de las PI3K de Clase IA. En la parte superior de la imagen, un modelo tridimensional de la estructura terciaria de la subunidad catalítica p110 α en complejo con los dominios nSH2 e iSH2 de la subunidad regulatoria p85 α , que aparecen en verde y azul intenso en la figura tridimensional (Protein Data Bank ID 3HHM). En la parte inferior, la distribución de los diferentes dominios de la subunidades catalítica y regulatoria en la estructura primaria de la proteína.

2.3. Regulación y activación de las PI3K de Clase IA

En condiciones basales la subunidad catalítica de las PI3K de Clase IA p110 se halla en el citoplasma y su actividad está modulada negativamente a través de la interacción con la subunidad regulatoria, la cual estabiliza a p110 y la mantiene en un estado de baja actividad a través de la interacción entre su dominio iSH2 con el dominio ABD de p110 (Dhand *et al.*, 1994); además se han descrito otras interacciones inhibitorias que se producen entre el dominio N-terminal de p85 (nSH2) y el dominio helicoidal de p110

(Miled *et al.*, 2007). En condiciones de estimulación, se produce la activación de receptores con actividad tirosín-quinasa, como por ejemplo EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*), IGF-R (*Insulin-like Growth Factor Receptor*) y HER2 (*Human Epidermal Receptor 2*) y el reclutamiento del dímero p85/p110 desde el citoplasma a la membrana plasmática (Figura 4). La subunidad regulatoria interacciona mediante sus dominios nSH2 y cSH2 con los residuos de fosfotirosina del receptor y esta interacción libera a la subunidad catalítica del efecto regulatorio negativo que ejerce p85, quedando así activa para catalizar la conversión del PtdIns-4,5P₂ en PtdIns-3,4,5P₃ (Yu *et al.*, 1998). Adicionalmente, se ha demostrado que la forma activada de la GTPasa Ras, Ras-GTP, interacciona con la subunidad catalítica de PI3K a través del RBD, estimulando su actividad quinasa de lípidos y promoviendo su total activación (Kodaki *et al.*, 1994; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996). Las subunidades catalíticas p110β y p110γ se activan y acceden a la membrana plasmática principalmente a través de su interacción con las subunidades βγ de las proteínas G heterotriméricas acopladas al receptor GPCR (Kurosu *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 1999; Guillermet-Guibert *et al.*, 2008).

2.4. Señalización mediada por la ruta PI3K/Akt

El PtdIns-3,4,5P₃ generado por la acción de las PI3K de Clase IA promueve la translocación a la membrana de una serie de proteínas citoplasmáticas, como la proteína-quinasa B (PKB)/Akt, de la cual existen tres isoformas Akt1, Akt2 y Akt3, y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*), las cuales interaccionan con el PtdIns-3,4,5P₃ a través de sus dominios PH (*Pleckstrin Homology*) y quedan de esta manera en un contexto de proximidad en la célula. Una vez en la membrana, Akt es fosforilada primeramente por PDK1 en su residuo Thr308 (Alessi *et al.*, 1997), y es completamente activada tras sufrir una segunda fosforilación por mTORC2 (*mTor complex 2*) en la posición Ser473 (Sarbasov *et al.*, 2005). Akt a su vez fosforila y regula un amplio número de efectores intracelulares (Figura 4) para llevar a cabo numerosas funciones celulares. A través de la fosforilación del factor proapoptótico BAD [*B cell lymphoma 2 (BCL-2) Antagonist of cell Death*] (Datta *et al.*, 1997), de la caspasa 9 (Cardone *et al.*, 1998) y de los factores de transcripción FoxO (*Forkhead box O*) (Brunet *et al.*, 1999), Akt inhibe la apoptosis, incrementando la supervivencia celular. Por otra parte, a través de la fosforilación inhibitoria de la GSK3-β (*Glycogen Synthase Kinase 3-β*) inhibe la síntesis de glucógeno y estimula la glicólisis y el

metabolismo glucídico (Shaw *et al.*, 1997; Foukas *et al.*, 2006). Akt también promueve la progresión a través del ciclo celular (Martelli *et al.*, 2012; Vadlakonda *et al.*, 2013). Por un lado fosforila e inactiva las proteínas p21 (Zhou *et al.*, 2001) y p27 (Shin *et al.*, 2002), cuya función es inhibir la progresión en el ciclo celular y forman parte de la familia de inhibidores de las CDK (*Cyclin-Dependent Kinases*). Por otro, a través de GSK3- β , activa la función de la ciclina D1 (Diehl *et al.*, 1998) y del factor de transcripción c-Myc (Gregory *et al.*, 2003).

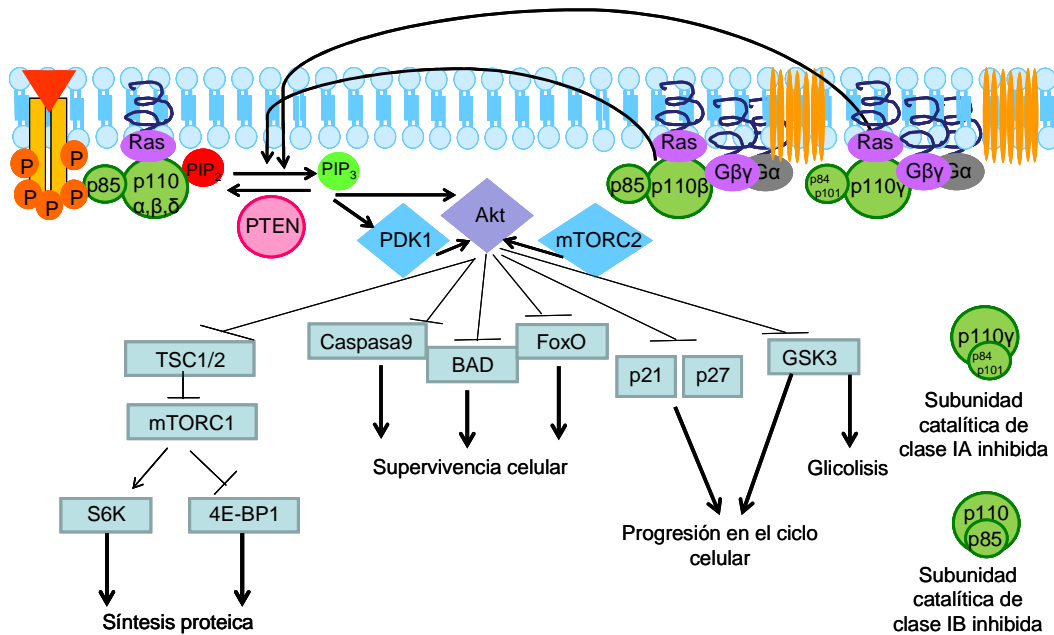


Fig.4. Señalización intracelular mediada por PI3K/Akt: principales efectores celulares y funciones celulares que regula.

Akt, participa en la regulación de la síntesis proteica y favorece el crecimiento celular y la proliferación mediante la quinasa mTOR (Figura 4) (Zoncu *et al.*, 2011; Altomare y Khaled, 2012). Esta quinasa se encuentra formando parte de dos complejos en las células de mamífero, mTORC1 y mTORC2, que se diferencian en función de las proteínas accesorias que junto con mTOR forman parte del complejo. Akt fosforila a TSC2 (*Tuberous Sclerosis Protein 2*) (Dan *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2002), inhibiendo la actividad del complejo TSC1/TSC2 lo que estimula la actividad de mTORC1; esto produce el incremento de la síntesis proteica a través de la activación de la quinasa ribosomal S6K (*p70 ribosomal protein S6 Kinase*) y de la inhibición de las proteínas de unión al factor de iniciación 4EBP1 (*inhibitory 4E-Binding Protein 1*). El complejo

mTORC2 parece estar activado por factores de crecimiento y, a diferencia del complejo mTORC1, es un activador de Akt (Sarbasov *et al.*, 2005) y regula funciones celulares relacionadas con la polarización celular y el citoesqueleto.

Existen otros efectores celulares que contienen dominios de interacción con PtdIns-3,4,5P₃ que también contribuyen a la señalización mediada por PI3K; tal es el caso de la centaurina- α 1, que actúa como GAP de la GTPasa Arf6 que participa en la regulación de la polimerización de actina (Venkateswarlu *et al.*, 2004), o de la proteína quinasa C atípica relacionada con la señalización de insulina (Farese *et al.*, 2005).

El regulador negativo principal de la ruta PI3K/Akt es la proteína PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog deleted in chromosome ten*). PTEN es una lípido fosfatasa que desfosforila el PtdIns-3,4,5P₃ (Figuras 1 y 4), ejerciendo una función antagónica a la de PI3K, en la cual radica su papel como supresor de tumores (Maehama y Dixon, 1998; Maehama *et al.*, 2001). También puede actuar sobre proteínas; de hecho presenta actividad proteína fosfatasa sobre sustratos fosforilados en Tyr-, Ser- y Thr- (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, su principal función fisiológica *in vivo* se lleva a cabo contrarrestando la activación en la ruta PI3K/Akt (Shi *et al.*, 2012).

3. PI3K y enfermedad: alteraciones de la ruta implicadas en oncogénesis

Como ya se ha comentado, la actividad PI3K es muy relevante en el control de la apoptosis y de la división y proliferación celular. La sobreexpresión o hiperactivación de las PI3K de Clase I así como la pérdida de la regulación de alguno de los elementos que componen la ruta de señalización en la que interviene esta quinasa y que impliquen un incremento en los niveles de PtdIns-3,4,5P₃, están íntimamente relacionados con la aparición y la progresión de tumores en mamíferos (Hemmings y Restuccia, 2012; Martini *et al.*, 2013). Además las alteraciones en la regulación de esta ruta también contribuyen a la aparición de otras patologías. De hecho, se ha relacionado a las isoformas PI3K γ y δ , mayoritariamente expresadas en leucocitos, con la alergia y la inflamación, la artritis reumatoide y la aterosclerosis (Ghigo *et al.*, 2010). A nivel de los cardiomiocitos la hiperactivación de la ruta promueve la hipertrofia cardíaca, lo que acaba ocasionando una reducción de la capacidad contráctil del músculo cardíaco (Aoyagi y Matsui, 2011). La señalización mediada por esta ruta está también

directamente relacionada con la hiperinsulinemia, obesidad, enfermedad metabólica y diabetes, dado que la insulina media sus efectos a través de la interacción con receptores RTKs que estimulan a PI3K (Schultze *et al.*, 2012; Vucenik y Stains, 2012; Braccini *et al.*, 2012).

Con respecto a la implicación de esta ruta en la oncogénesis, las principales alteraciones moleculares que conllevan un aumento en la señalización a través de la ruta PI3K/Akt y que confieren, en base a las funciones que ésta regula en la célula, ventajas a las células tumorales para su proliferación y supervivencia quedan recogidas en la Tabla 2.

La hiperactivación de la ruta se puede producir al nivel de los receptores; en ocasiones los RTKs pueden hallarse mutados, amplificados o sobreexpresados. Por ejemplo, se han aislado mutaciones somáticas de ganancia de función en el receptor EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*) en tumores de pulmón, entre los que un 27,54% contienen mutaciones en este receptor (COSMIC, *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). También es muy común la amplificación o sobreexpresión de HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) en tumores de mama, hasta en un 30%, lo cual ocasiona la activación de la ruta (Arpino *et al.*, 2004; De Laurentiis *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2006).

En cuanto a la alteración de la propia PI3K, hasta el momento la subunidad catalítica de Clase I y, dentro de esta, la isoforma p110 α es la que presenta una mayor implicación en tumorigénesis (Zhang *et al.*, 2003; Samuels *et al.*, 2004; Steelman *et al.*, 2011; McCubrey *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2012). La pérdida de regulación es normalmente la consecuencia de la aparición de mutaciones de ganancia de función en el gen *PIK3CA*, que codifica para la subunidad catalítica de la PI3K α . Existen dos regiones calientes (“*hot spot*”) en los exones que codifican respectivamente para el dominio helicoidal y para el dominio quinasa donde se concentran la mayor parte de las mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA* que confieren una ganancia de función. De éstas, las más prevalentes entre las que se localizan en el primero son E542K y E545K, y ambas implican la pérdida de interacción entre el dominio N-terminal SH2 de la subunidad reguladora p85 α y la p110 α (Kang *et al.*, 2005; Miled *et al.*, 2007). Más frecuente aún es la mutación oncogénica H1047R, que se localiza en el dominio quinasa y parece inducir un cambio alostérico en

Tabla 2. Alteraciones moleculares más frecuentes relacionadas con una hiperactivación de la ruta PI3K-Akt en cáncer y los tejidos en que se presentan.

Gen (Proteína)	Alteración molecular	Tejido	Referencia
ERBB2 (HER2)	Amplificación o sobreexpresión	Mama	(Arpino <i>et al.</i> , 2004; De Laurentiis <i>et al.</i> , 2005; Ellis <i>et al.</i> , 2006)
EGFR (E-GFR)	Mutación de ganancia de función	Pulmón	COSMIC
	Amplificación	Mama	(Arpino <i>et al.</i> , 2004; De Laurentiis <i>et al.</i> , 2005; Ellis <i>et al.</i> , 2006)
PIK3CA(p110α)	Mutación de ganancia de función	Mama, endometrio, tracto urinario	COSMIC
PIK3CB(p110β)	Amplificación	Ovario	(Shayesteh <i>et al.</i> , 1999)
	Sobreexpresión	Próstata	(Zhu <i>et al.</i> , 2008; Lee <i>et al.</i> , 2010)
PIK3CD(p110δ)	Sobreexpresión	Leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin	(Tzenaki y Papakonstanti, 2013)
PIK3CD(p110γ)	Sobreexpresión	Leucemia aguda linfoblástica	(Subramaniam <i>et al.</i> , 2012)
PIK3R1(p85α,p55α,p50α)	Mutaciones activadoras que eliminan el efecto inhibitorio que ejerce la subunidad reguladora sobre la catalítica	Endometrio, colon, cervix	COSMIC; (Jaiswal <i>et al.</i> , 2009; Urlick <i>et al.</i> , 2011; Cheung <i>et al.</i> , 2011)
PIK3R2(p85β)	Mutaciones activadoras que eliminan el efecto inhibitorio que ejerce la subunidad reguladora sobre la catalítica	Estómago; endometrio	COSMIC; (Cheung <i>et al.</i> , 2011)
PTEN (PTEN)	Mutación de pérdida de función	Vulva, endometrio sistema nervioso central, piel, colon, próstata	COSMIC
	Deleción Disminución de la expresión por regulación epigenética	Próstata	(Krohn <i>et al.</i> , 2012) (Garcia <i>et al.</i> , 2004; Goel <i>et al.</i> , 2004)
KRAS (K-Ras)	Mutación de ganancia de función	Páncreas, intestino, tracto biliar, pulmón	COSMIC
AKT1(Akt1)	Mutación de ganancia de función	Mama, tracto urinario, tiroides y colon	COSMIC
AKT2(Akt2)	Amplificación	Ovario	(Cheng <i>et al.</i> , 1992; Bellacosa <i>et al.</i> , 1995)
AKT3(Akt3)	Mutación de ganancia de función	Melanoma	COSMIC (Davies <i>et al.</i> , 2008)
	Amplificación	Mama, ovario	COSMIC

la proteína que mimetiza la unión con Ras-GTP (Zhao y Vogt, 2008; Burke *et al.*, 2012). Estas mutaciones implican una ganancia en la actividad lípido quinasa de la proteína (Carson *et al.*, 2008). También se han hallado una serie de mutaciones en el dominio ABD que implican una ganancia en la actividad catalítica de la proteína y no afectan a la interacción de p85 α con p110 α , así como otras de escasa frecuencia distribuidas a lo largo de la proteína (COSMIC). Las mutaciones de ganancia de función en este gen están implicadas en el desarrollo del 24,8% de los tumores de mama, 22,48% de endometrio, 17,5% de tracto urinario y 13,5% de colon (COSMIC). Por otro lado, la amplificación del gen *PIK3CA* se ha descrito como un mecanismo de hiperactivación de la ruta hasta en el 40% de los tumores de ovario (Shayesteh *et al.*, 1999).

Con respecto al papel en cáncer de las otras isoformas de la subunidad catalítica de PI3K, p110 β , p110 δ y p110 γ , no se han encontrado mutaciones oncogénicas en clínica, pese a que se ha descrito que su sobreexpresión induce transformación oncogénica en cultivos celulares (Kang *et al.*, 2006). Hay datos que sugieren una relevancia de la isoforma p110 β en la transformación que se produce en tumores en los que existe una previa deficiencia en PTEN (Jia *et al.*, 2008; Wee *et al.*, 2008). La expresión de la isoforma p110 δ se ha encontrado incrementada en enfermedades proliferativas de las células sanguíneas, tales como leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple o linfoma de Hodgkin (Tzenaki *et al.*, 2013), por el importante papel que desempeña en éstas. Se ha establecido recientemente la implicación de la sobreexpresión de la isoforma p110 γ también en enfermedades sanguíneas, como la leucemia aguda linfoblástica (Subramaniam *et al.*, 2012), así como un posible papel en la metástasis en cáncer de mama (Xie *et al.*, 2013).

Pese a que es menos frecuente, la subunidad reguladora p85 α también está implicada en la oncogénesis causada por hiperactivación de la ruta. Existen mutaciones en el gen que codifica esta proteína, *PIK3R1*, que eliminan el efecto inhibitorio que ejerce esta subunidad reguladora sobre la catalítica y que se han encontrado en cáncer de endometrio (15%), colon (6,7%) y cérvix (3,7%) (COSMIC). Asimismo se ha descrito la existencia de una versión truncada en un linfoma humano, p76, que carece del dominio cSH2 (Jucker *et al.*, 2002), lo que pone de manifiesto la importancia del mecanismo de inhibición y estabilización de la subunidad reguladora sobre la catalítica. Se han aislado

mutaciones en el gen *PIK3R2*, que codifica la subunidad reguladora p85 β , en tumores de estómago (4,17%) y de endometrio (1,32%) (COSMIC).

La principal alteración de esta ruta que produce la transformación oncogénica de las células es la pérdida de actividad fosfatasa de la proteína PTEN, que regula negativamente los niveles de PtdIns-3,4,5P₃. Se han encontrado mutaciones en PTEN en el 50% de tumores de vulva, en el 38% de endometrio, en el 15% en sistema nervioso central, 12% de piel, 11,4% de colon y 10,5% de próstata, entre otros muchos (COSMIC). Las mutaciones germinales se presentan muy frecuentemente en ciertos tipos de tumores hereditarios; de hecho alrededor del 60–80% de pacientes con PHTSs (*PTEN Hamartoma Tumour Syndrome*), como la enfermedad de Cowden, presentan mutaciones de este tipo (Aguissa-Toure y Li, 2012). Éstas son principalmente mutaciones de cambio de sentido que afectan al dominio fosfatasa (Orloff y Eng, 2008), aunque también se han descrito otras que alteran la ubiquitinación de PTEN preservando su actividad catalítica (Trotman *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayor parte de las alteraciones genéticas en tumores esporádicos son mutaciones somáticas de pérdida de función de la proteína, que se localizan frecuentemente en el dominio responsable de su actividad fosfatasa. Es común la pérdida alélica de una de las copias del gen en un 30% de los casos en que existe alteración en este gen (Singh *et al.*, 1998). Además existen alteraciones epigenéticas, como la hipermetilación del promotor, que conlleva una disminución en la expresión de PTEN (Garcia *et al.*, 2004a).

La hiperactivación de la ruta se puede producir también a nivel de la proteína Ras que, como se ha mencionado, además de ejercer una gran variedad de funciones en la célula de mamífero, regula positivamente la actividad de PI3K. El gen que codifica la proteína K-Ras (*KRAS*) presenta un papel establecido como oncogén en numerosos tumores (Baines *et al.*, 2011); las mutaciones de ganancia de función en este oncogén se presentan en el 57% de los tumores de páncreas, 37,50% de los tumores de colon, 27% de vías biliares y 21% de intestino delgado, entre otros muchos (COSMIC). La subunidad catalítica p110 α está directamente implicada en la transformación ejercida por estas versiones oncogénicas de Ras (Castellano y Downward, 2010). Su contribución a la transformación oncogénica en este contexto se demostró en modelos animales en que un mutante de p110 α incapaz de interaccionar con una versión oncogénica de Ras no desarrollaba el proceso tumorigénico (Gupta *et al.*, 2007).

Existen también mutaciones somáticas de ganancia de función en los genes que codifican las tres isoformas de Akt, *AKT1*, *AKT2* y *AKT3*, relacionadas con procesos oncogénicos. La presencia de mutaciones en el gen *AKT1* se ha encontrado en tumores de mama (3,53%), tracto urinario (2,73%), tiroides (2,48%) y colon (1,14%) (COSMIC). Es frecuente la aparición de la sustitución E17K en el dominio PH de Akt1, la cual hace que se localice en mayor medida en la membrana plasmática por aumentar la afinidad en la unión con el PtdIns-3,4,5P₃ (Carpten *et al.*, 2007). La amplificación de *AKT2* se ha descrito en tumores de mama y ovario (Cheng *et al.*, 1992; Bellacosa *et al.*, 1995). Recientemente se han hallado mutaciones de ganancia de función en el gen *AKT3* en melanomas (Davies *et al.*, 2008) y su amplificación en tumores de mama (64%) y ovario (44%) (COSMIC).

Las alteraciones descritas se pueden producir además de forma concurrente en varios de los elementos implicados en la señalización de la ruta en el mismo tumor. Por ejemplo, se ha descrito que aproximadamente el 24% de los tumores de colon contienen mutaciones en *KRAS* y en *PIK3CA* (Parsons *et al.*, 2005); estas dos mutaciones también se presentan de manera conjunta en tumores de endometrio, tiroides y en leucemia linfoblástica aguda (Yeang *et al.*, 2008; Xing, 2010). Algunos tumores pancreáticos contienen mutaciones en *KRAS* y amplificaciones en *AKT2* (Tuveson y Hingorani, 2005). También se han hallado mutaciones en el gen *PTEN* que co-existen con mutaciones en *PIK3CA* en un porcentaje significativo de tumores (Perez-Tenorio *et al.*, 2007).

4. Inhibidores de la ruta de señalización PI3K/Akt

Debido al importante papel que esta ruta desempeña en la oncogénesis en células de mamíferos, las proteínas que la integran son dianas de fármacos antitumorales. La investigación en este campo ha promovido el desarrollo de numerosos fármacos dirigidos a bloquear la señalización mediada por esta ruta, algunos de los cuales están siendo evaluados en ensayos clínicos (Figura 5).

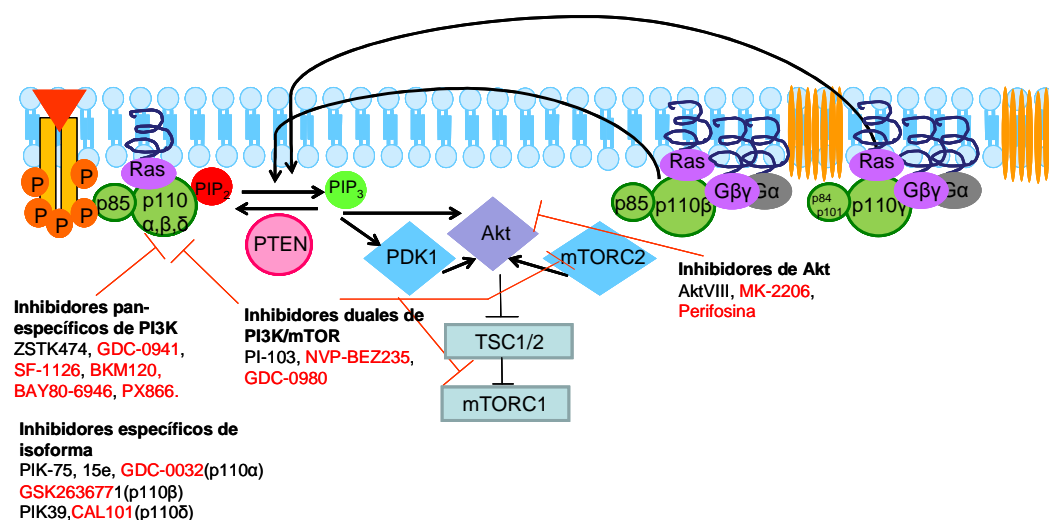


Fig.5. Inhibidores de la ruta de señalización PI3K/Akt. Los compuestos que están siendo evaluados en ensayos clínicos están señalados en color rojo.

4.1. Inhibidores duales de PI3K/mTOR

Los primeros inhibidores de la activación de esta ruta fueron los compuestos que inhibían el complejo mTORC1, como la rapamicina y sus análogos y cuya eficacia en el tratamiento de cáncer ha mostrado importantes limitaciones (Mita *et al.*, 2003; Bjornsti y Houghton, 2004). Posteriormente se han desarrollado una serie de compuestos que bloquean la actividad tanto de PI3K como de la proteína quinasa mTOR. Esta inhibición dual se debe a la similitud estructural que existe entre el dominio catalítico de ambas proteínas, como se ha mencionado previamente (Lempiainen y Halazonetis, 2009). Esto supone una ventaja terapéutica en algunos aspectos ya que supone la inhibición de la ruta a distintos niveles: bloqueando la actividad de mTOR en los complejos mTORC1 y mTORC2, y la de PI3K.

Entre estos se encuentra el compuesto PI-103, obtenido por síntesis dirigida y que posee mayor selectividad frente a PI3Ks de Clase I. Esta molécula ha demostrado una elevada potencia en modelos celulares y animales, pero presenta los inconvenientes de ser metabolizada rápidamente y poco soluble (Raynaud *et al.*, 2007). El compuesto NVP-BEZ235 es otro potente inhibidor dual de mTOR y de PI3K, cuya eficacia frente a la transformación inducida por mutantes oncogénicos de PI3K ha sido evaluada en modelos animales (Serra *et al.*, 2008; Maira *et al.*, 2008). Se encuentra en ensayos

clínicos en fase II en tumores de mama, mostrando resultados prometedores y un adecuado perfil de toxicidad (Kurtz y Ray-Coquard, 2012), <http://www.clinicaltrials.gov>]. El inhibidor GDC-0980 (Wallin *et al.*, 2011), desarrollado posteriormente, también se encuentra en ensayos clínicos en fase I frente a tumores de próstata y mama, entre otros (<http://www.clinicaltrials.gov>).

4.2. Inhibidores de PI3K

4.2.1. Inhibidores pan-específicos de PI3K

La mayoría de los inhibidores de PI3K, como casi todos los inhibidores de las quinasas, son inhibidores competitivos que se unen al bolsillo de unión del ATP, bloqueando la entrada de ATP. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la elevada similitud entre los bolsillos de unión a ATP de las quinasas dificulta el desarrollo de compuestos selectivos, por lo que la mayor parte de los inhibidores bloquean la actividad de las tres clases de PI3K, y por ello se les conoce como inhibidores pan-específicos de PI3K.

La wortmanina, metabolito natural de origen fúngico, fue el primer inhibidor caracterizado de PI3K (Arcaro y Wymann, 1993). Es un inhibidor inespecífico de todas las isoformas de PI3K que manifiesta reactividad cruzada con proteínas quinasas relacionadas estructuralmente, como mTOR, DNA-PK o ATM. Actúa bloqueando el bolsillo de unión de ATP de las quinasas mediante unión covalente, causando por lo tanto una inhibición irreversible. El primer inhibidor sintético de PI3K fue LY294002, obtenido por la compañía *Lilly*, cuya estructura se basó en la del flavonoide quercetina, inhibidor de quinasas de amplio espectro. El estudio de la estructura cristalográfica de la PI3Kγ unida a wortmanina, LY294002 y quercetina (Walker *et al.*, 2000) permitió el estudio de las interacciones químicas que determinan la inhibición de PI3K. Pese a que estos dos compuestos presentan poca selectividad y características farmacocinéticas inadecuadas, han servido como herramientas para el desarrollo de nuevos inhibidores de PI3K.

Actualmente, existen numerosos compuestos que inhiben pan-específicamente PI3K, muchos de los cuales se están evaluando en ensayos clínicos. El compuesto ZSTK474 fue obtenido mediante síntesis química a partir del LY294002 y manifiesta más potencia que éste (Yaguchi *et al.*, 2006; Kong y Yamori, 2007). Se encuentra en ensayos clínicos en fase II frente a tumores sólidos en estado avanzado (<http://www.clinicaltrials.gov>). El

inhibidor GDC-0941 (Folkes *et al.*, 2008) se encuentra actualmente en fase II en diversos ensayos clínicos frente a tumores de mama [(Martini *et al.*, 2013) <http://www.clinicaltrials.gov>]. Por otro lado, la molécula SF-1126 es un profármaco de LY294002 conjugado a un tetrapéptido diseñado para ser activado en la vasculatura del tumor, y que inhibe tanto la proliferación del tumor como la angiogénesis (Garlich *et al.*, 2008). Actualmente se está ensayando frente a tumores sólidos en estado avanzado o metastático (<http://www.clinicaltrials.gov>).

Otros pan-inhibidores de PI3K que están siendo estudiados en ensayos clínicos son BKM120 [(Maira *et al.*, 2012), Novartis], el cual muestra particular selectividad por las isoformas de Clase I, BAY80-6946 (Bayer) y PX866 (Oncothyreon) [<http://www.clinicaltrials.gov> (Martini *et al.*, 2013a)].

4.2.2. Inhibidores de PI3K selectivos de isoforma

La inhibición específica de una determinada isoforma de PI3K minimizaría los efectos tóxicos colaterales que se derivan de inhibir otras quinasas. Los estudios realizados por Knight y colaboradores (Knight y Shokat, 2005; Knight *et al.*, 2006) permitieron el estudio de los determinantes de especificidad en la unión de un compuesto a una quinasa particular. Existen una serie de inhibidores de PI3K no empleados en clínica que resultan selectivos de isoforma como por ejemplo PIK-75 (Hayakawa *et al.*, 2007) y 15e (Hayakawa *et al.*, 2006) (inhibidores de p110 α), PIK-90 y PIK-93 (Knight *et al.*, 2006) (inhibidores de p110 α/γ) y PIK39 (inhibidor de p110 δ). Todos ellos son sumamente potentes, pero debido a su toxicidad e inadecuadas características farmacocinéticas solo han sido empleados para el estudio e investigación de la PI3K.

Hasta el momento los compuestos que han manifestado este tipo de selectividad y se están evaluando en clínica son: GDC-0032, un inhibidor específico de la isoforma p110 α desarrollado recientemente que se encuentra en ensayos clínicos en fase I frente a tumores de mama [(Ndubaku *et al.*, 2013) <http://www.clinicaltrials.gov>]; GSK2636771 (GlaxoSmithKline), específico frente a p110 β , que se encuentra en ensayos en fase I y II en tumores en los que existe una previa deficiencia en PTEN (<http://www.clinicaltrials.gov>); y CAL101 (Calistoga Pharmaceuticals), específico de la isoforma p110 δ , que está siendo empleado en ensayos en fase I frente a leucemia linfocítica crónica y linfomas (<http://www.clinicaltrials.gov>).

4.3. Inhibidores de Akt

El desarrollo de inhibidores de Akt ha sido más tardío con respecto a los de PI3K. La inhibición selectiva de Akt resulta particularmente complicada, dado que su bolsillo catalítico presenta elevada similitud con el de otras AGC quinasas, como la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) (Lindsley *et al.*, 2007).

Parece que la inhibición alostérica de Akt confiere mayor especificidad en el bloqueo (Lindsley *et al.*, 2005). En consecuencia, la mayoría de inhibidores de Akt actúan por inhibición alostérica. El compuesto AktVIII (Calleja *et al.*, 2009), se une a dos zonas funcionalmente distintas de la proteína para impedir la activación de Akt por otras proteínas. El inhibidor MK-2206, es asimismo un inhibidor alostérico que está siendo evaluado en la actualidad en diversos ensayos en fase I (<http://www.clinicaltrials.gov>). Sin embargo, la perifosina (Kondapaka *et al.*, 2003) es otro inhibidor de Akt que pertenece a un amplio grupo de moléculas llamadas alquilfosfolípidos cuyo mecanismo de acción de forma general es el bloqueo de la interacción con las membranas (van Blitterswijk y Verheij, 2013); la perifosina se une al dominio PH de Akt bloqueando su interacción con el PtdIns-3,4,5P₃ de la membrana plasmática. Se encuentra en diversos ensayos clínicos en fases I y II (<http://www.clinicaltrials.gov>).

En general, los inhibidores de la ruta PI3K/Akt que están siendo evaluados en ensayos clínicos parecen resultar bastante efectivos y relativamente bioseguros, si bien muchos de ellos ocasionan hiperglucemia por bloquear la señalización mediada por la insulina. Por ello, aún se requiere incrementar el arsenal de moléculas con actividad frente a PI3K o Akt, dado que la optimización de las características farmacocinéticas, la selectividad de la terapia sobre las proteínas determinantes de la transformación oncogénica de cada tumor en particular y la defensa frente al posible desarrollo de resistencias es esencial para que la terapia sea efectiva.

5. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo en biomedicina y plataforma para el descubrimiento de fármacos

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular eucariótico que se ha empleado empíricamente desde tiempos inmemoriales para la fabricación del vino, el pan y la cerveza. Su ciclo biológico presenta dos formas celulares: haploide y diploide.

Las células haploides pueden ser de tipo sexual *MATa* o *MATα*. Se reproducen sexualmente por apareamiento con una célula de tipo sexual opuesto, dando lugar a una célula diploide. En condiciones desfavorables las células diploides llevan a cabo la meiosis acoplada a un proceso de esporulación, generando un asca con cuatro ascosporas, dos de tipo sexual *MATa* y dos *MATα*. Actualmente, el profundo conocimiento que se ha alcanzado sobre la biología de este organismo y su manipulación genética ha motivado una amplia utilización industrial, no sólo para la fabricación de estos alimentos sino para otros usos biotecnológicos (producción de vacunas, hormonas recombinantes, etc.). En investigación, *S. cerevisiae* es un organismo modelo muy empleado para el estudio de procesos biológicos a nivel celular, molecular, genético y genómico.

S. cerevisiae presenta numerosas características que lo convierten en un microorganismo idóneo como modelo de experimentación. Por ejemplo, su cultivo es sencillo, económico y presenta un rápido crecimiento, con un tiempo de generación de aproximadamente 90 minutos en condiciones óptimas, lo cual facilita su manejo en el laboratorio. Su modificación genética es viable gracias a la facilidad con que se puede transformar e integrar DNAs exógenos, o bien inactivar o eliminar sus propios genes. Además, dado que puede alternar un ciclo vegetativo haploide y otro diploide mediante un ciclo sexual, puede emplearse para la realización de genética mendeliana clásica y la obtención de combinaciones de mutaciones múltiples mediante cruzamiento.

La biología de este organismo está ampliamente caracterizada y, en muchos casos, sirve como base para el estudio de la de los organismos eucarióticos superiores en virtud de la conservación funcional de muchos procesos. El genoma de *S. cerevisiae* consta de 16 cromosomas en los cuales existen algo más de 6000 genes. La secuenciación del genoma de este organismo ha permitido el desarrollo de herramientas para el análisis de las interacciones que se establecen a nivel molecular dentro de la célula de levadura. Entre estas herramientas se encuentran las colecciones de mutantes, tanto haploides como diploides, delecionados en cada uno de los genes no esenciales (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002), que se han reemplazado por una *cassette* de resistencia a un antibiótico y unas secuencias flanqueantes sintéticas que son únicas y permiten su identificación. Estas colecciones están siendo muy útiles para la búsqueda de la función de numerosos genes a través de análisis fenotípicos sistemáticos (Scherens y Goffeau,

2004). Además también permiten el establecimiento de relaciones funcionales entre distintos genes. En ocasiones la pérdida simultánea de dos elementos implicados en un proceso biológico común puede tener consecuencias fenotípicas, y ello permite el hallazgo de interacciones genéticas (Enserink, 2012). Las colecciones pueden asimismo ser empleadas para la identificación de dianas de compuestos activos, lo que se denomina *Chemical-Genomics* o *Chemical profiling*, y supone una importante aportación de este organismo modelo a la investigación aplicada. Su objetivo es el establecimiento de relaciones funcionales entre genes y compuestos químicos mediante el análisis genómico sistemático. La comparación de los efectos que causa el tratamiento con un compuesto con el perfil fenotípico que origina un compuesto de actividad conocida, puede ayudar a inferir el modo de acción por analogía (Parsons *et al.*, 2004; Hoon *et al.*, 2008; Hillenmeyer *et al.*, 2008; Hillenmeyer *et al.*, 2010). Además de las citadas colecciones de mutantes también se han generado colecciones genómicas de sobreexpresión (Ramer *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992) y de fusiones a GFP para estudios de localización celular (Huh *et al.*, 2003).

Por otro lado, en comparación con otros organismos, en levadura existen una gran variedad de técnicas que permiten, de forma sencilla, el estudio a gran escala de la expresión génica y su regulación, así como de la función de las proteínas en el ámbito de la transcriptómica y la proteómica, entre otras (Botstein y Fink, 2011). Además se han desarrollado numerosas herramientas bioinformáticas que facilitan el procesamiento de los resultados de estos estudios realizados a escala genómica. Gracias a todo ello la anotación funcional del genoma de este organismo se encuentra muy avanzada y está disponible en numerosas bases de datos, sujetas a una constante actualización, como por ejemplo SGD (<http://www.yeastgenome.org>).

Además de todo ello, este organismo presenta una gran utilidad para el estudio de los procesos moleculares y metabólicos de la célula eucariótica, incluyendo aquellos conservados en mamíferos relacionados con trastornos patológicos, tales como enfermedades infecciosas, degenerativas y proliferativas, ya que aproximadamente el 30% de los genes humanos implicados en enfermedades presentan homólogos en levadura (Foury, 1997). El abordaje del estudio de enfermedades humanas en este organismo puede llevarse a cabo bien por complementación de un mutante con un gen humano que pudiese desempeñar una función homóloga en levadura (Osborn y Miller,

2007) o bien expresando un gen humano que carece de homólogo, que provoque algún fenotipo detectable. En ambos casos el modelo obtenido se denomina “levadura humanizada” (Foury, 1997; Mager y Winderickx, 2005).

5.1. Expresión de genes heterólogos en *S. cerevisiae*: desarrollo de levaduras humanizadas para el estudio de genes implicados en patologías

La expresión de genes humanos que codifican dianas farmacológicas de interés en el modelo de levadura ha dado lugar al desarrollo de herramientas extremadamente útiles para estudios moleculares y farmacológicos. Por ejemplo, se puede generar una “levadura humanizada” en la que se recomponga una ruta o una función celular de la cual carezca constitutivamente *S. cerevisiae*. Ello es posible mediante la expresión de un cDNA humano clonado en un plásmido de expresión condicional en esta levadura. En muchos casos la proteína expresada ocasiona un fenotipo concreto que permite su estudio y análisis en profundidad en este sistema (Bjornsti, 2002; Mager *et al.*, 2005). Por ejemplo, Tugendreich *et al.* (2001) expresaron en levadura numerosos cDNAs que codificaban proteínas relacionadas con enfermedades humanas, constatando que algunas de ellas causaban un defecto en el crecimiento de *S. cerevisiae*, como p38, Parp-1 (*human Poly ADP-ribose polymerase*), la GTPasa RhoC o la serín treonín quinasa Ark-1, entre otras, lo cual permitía la realización de rastreos dirigidos al aislamiento de mutaciones que anulasen dicho efecto.

Los estudios realizados en levaduras humanizadas han contribuido notablemente al conocimiento de patologías del sistema nervioso que cursan con la formación de agregados proteicos insolubles (Braun *et al.*, 2010). Se han establecido modelos para el estudio de la α -sinucleína, proteína que se acumula en la demencia y en el Parkinson, en los cuales la expresión de esta proteína causa la inhibición del crecimiento de la levadura, reproduciendo la formación de cuerpos de inclusión que se generan en las neuronas corticales por alteración del metabolismo lipídico y del tráfico vesicular (Outeiro y Lindquist, 2003; Outeiro y Giorgini, 2006; Zabrocki *et al.*, 2008). Asimismo se han empleado levaduras humanizadas para el estudio de enfermedades en las que la aparición anormal de secuencias de poliglutaminas en las proteínas conlleva su agregación, como sucede en la enfermedad de Huntington. En presencia de las proteínas priónicas endógenas de la levadura, la huntingtina forma agregados en

levadura que resultan igualmente citotóxicos (Meriin *et al.*, 2002; Duennwald *et al.*, 2006). Este modelo también se ha empleado en la búsqueda de proteínas supresoras de dicha actividad (Muchowski *et al.*, 2000; Krobitsch y Lindquist, 2000). Se han realizado estudios en levadura para evaluar la toxicidad de una versión que se secreta de la proteína β -amiloide, característica de la enfermedad de Alzheimer (Bharadwaj *et al.*, 2010). También se ha expresado la proteína TD43, relacionada con otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica. La expresión de esta proteína en levadura también resulta tóxica y ha permitido el hallazgo de proteínas que interaccionan funcionalmente con ella y modulan su toxicidad tanto en levaduras como en neuronas (Johnson *et al.*, 2008; Elden *et al.*, 2010).

Asimismo se han generado levaduras humanizadas para el estudio de otras patologías, como por ejemplo el cáncer. Nuestro grupo de investigación desarrolló una levadura humanizada mediante la expresión de la proteína oncogénica PI3K y el supresor de tumores PTEN (Andres-Pons *et al.*, 2007). La apoptosis también ha sido profundamente estudiada en levaduras humanizadas (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). La expresión del factor antiapoptótico Bcl2 previene la muerte celular e incrementa la longevidad celular de *S. cerevisiae* (Longo *et al.*, 1997). Por el contrario, la expresión heteróloga del factor pro-apoptótico Bax en levadura produce la liberación de citocromo C y la muerte por apoptosis de la célula de levadura (Eisenberg *et al.*, 2007).

Como variante a las levaduras humanizadas cabe mencionar que *S. cerevisiae* también resulta útil para la expresión de otros genes ausentes de forma natural en este organismo, como por ejemplo factores de virulencia de microorganismos patógenos. En este sentido es un modelo excelente de célula hospedadora para el estudio de proteínas translocadas por las bacterias patógenas al citoplasma de la célula eucariótica, ya que muchas de las dianas celulares de dichos factores están conservadas (Valdivia, 2004; Arnoldo *et al.*, 2008; Siggers y Lesser, 2008). Por ejemplo, Fernandez-Piñar *et al.* (2012) pusieron de manifiesto que la diana del factor de virulencia de *Salmonella* SteC en levadura es Cdc24, la GEF de la GTPasa Cdc42. Asimismo Rodríguez-Escudero *et al.* (2011a) demostraron que los efectos de la fosfatasa SopB translocada por *Salmonella* al interior de las células del epitelio intestinal, se deben en parte a la interacción directa con Cdc42. También se han expresado de forma heteróloga en levadura factores de virulencia de otros patógenos humanos no bacterianos, como el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$

(Salcedo-Sora *et al.*, 2012) o la dihidrofolato reductasa (Bilsland *et al.*, 2011) de *Plasmodium*, el parásito causante de la malaria.

5.2. Estrategias para la investigación con levaduras humanizadas

Como ya se ha mencionado, la interferencia en el crecimiento o la aparición de un fenotipo que se produce cuando se expresa un gen humano en levadura permite su estudio y análisis fácilmente en este organismo. La levadura ofrece numerosas posibilidades con este fin, algunas de las cuales están incluidas en la Figura 6.

El análisis mutagénico aporta valiosa información acerca de la relación estructura-actividad de la proteína de estudio (Beukers y Ijzerman, 2005). En primer lugar, se puede llevar a cabo un estudio funcional directo del gen a través de mutagénesis dirigida y así relacionar el fenotipo que se produce en estas condiciones con el efecto de la mutación introducida. Una técnica más sistemática de mutagénesis dirigida que puede emplearse cuando no se sabe con precisión qué residuos específicos se deben mutar es la llamada “*Alanine scanning*”. Ésta consiste en reemplazar sistemáticamente una serie de residuos por alanina, ya que su pequeño tamaño y ausencia de carga anula la función del aminoácido al que sustituye. De manera inversa, se pueden introducir mutaciones al azar en el gen de estudio empleando una PCR con tendencia a error y posteriormente seleccionar aquellos mutantes en los que se manifieste un efecto concreto, por ejemplo, la pérdida de estabilidad de proteína o la ganancia de función. Esta técnica resulta particularmente interesante para el estudio de genes cuya relación estructura-actividad no se encuentra caracterizada. Ambas aproximaciones se han llevado a cabo por nuestro equipo de investigación. Inicialmente, Andrés-Pons *et al.* (2007) identificaron nuevas mutaciones de pérdida de función de la fosfatasa PTEN mediante mutagénesis al azar. Posteriormente Rodríguez-Escudero *et al.* (2011b) llevaron a cabo un análisis estructural y funcional sobre diferentes dominios de PTEN a través de “*Alanine scanning*”, con el que confirmaron el efecto de mutaciones halladas en clínica y aislaron nuevas mutaciones que conferían pérdida de función y, por tanto, de su actividad supresora tumoral.

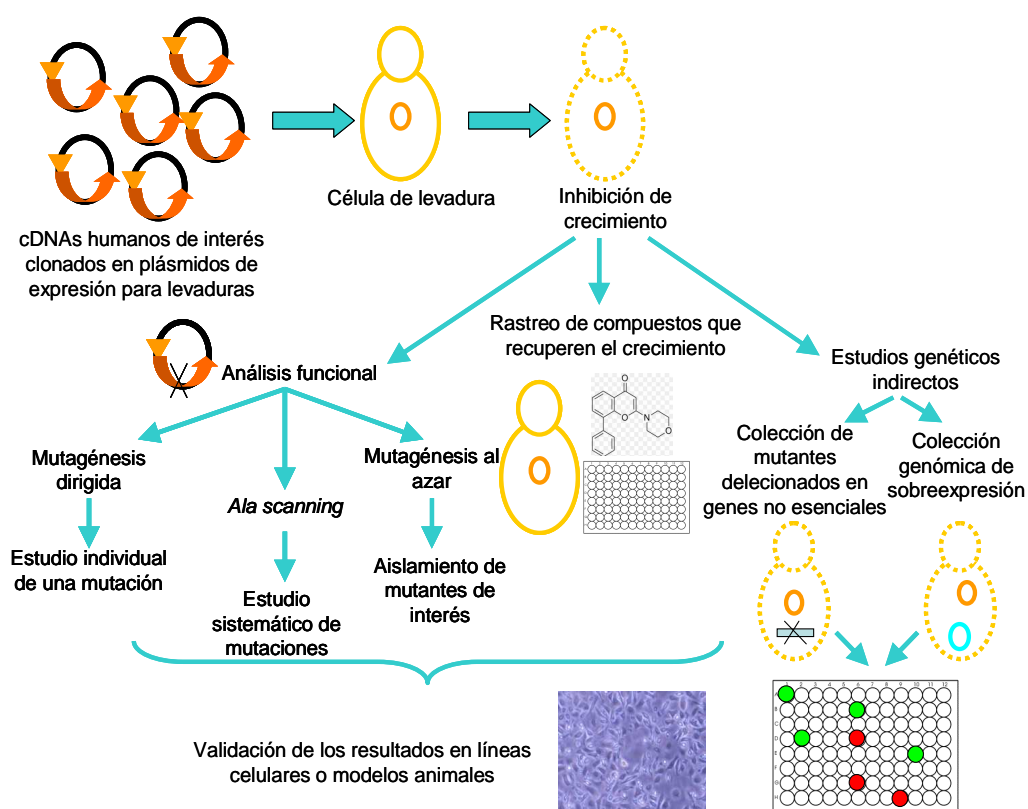


Fig.6. Estrategias para la investigación con levaduras humanizadas. El cDNA de interés clonado en un plásmido de expresión condicional en levaduras ocasiona la inhibición de su crecimiento. Esto permite llevar a cabo estudios funcionales mediante técnicas de mutagénesis; rastrear colecciones de compuestos en busca de moléculas que recuperen el crecimiento; y realizar estudios genéticos indirectos, para determinar posibles moduladores del fenotipo (que se indican en rojo y en verde en la placa multipocillo) empleando tanto la colección de mutantes delecionados en genes no esenciales como la colección genómica de sobreexpresión. Los resultados obtenidos en este sistema deben ser validados en líneas celulares.

Otra estrategia que permite la investigación en levaduras humanizadas implica el uso de la colección genómica de mutantes de levadura, para la búsqueda de mutantes en los que el fenotipo derivado de la expresión del gen humano se vea modificado. Esto permite el establecimiento de relaciones funcionales entre la proteína humana y los procesos que desencadena en la célula de levadura para ejercer su efecto. Esta estrategia es igualmente aplicable cuando se expresan de forma heteróloga otros genes, como los que codifican factores de virulencia bacterianos. Por ejemplo, Alto *et al.* (2006), expresaron en la colección de mutantes de levadura el factor de virulencia de *Shigella* IpgB2, y descubrieron mediante este método que esta proteína activa la señalización a través de una ruta de MAPK de levadura, dado que en mutantes de esta

ruta se suprimía el efecto inhibitorio que esta proteína provoca. De forma análoga, se puede utilizar la colección genómica de sobreexpresión o una simple genoteca de *S. cerevisiae* para la búsqueda de genes cuya sobreexpresión alteren en el efecto ocasionado por el gen humano.

En muchas ocasiones, el proceso molecular por el que la proteína heteróloga causa el fenotipo en levadura se encuentra conservado con respecto a la célula de mamífero, y en este caso se puede inferir cuál es el proceso alterado en la célula hospedadora. Esto ha sucedido, por ejemplo, con las proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas que generan agregados tanto en neuronas como en la célula de levadura. Treuch *et al.* (2011) hallaron como moduladores de la toxicidad ejercida por la proteína β -amiloide en levadura genes relacionados con la endocitosis, que demostraron ser factores de riesgo para padecer esta enfermedad. Chung *et al.* (2013) establecieron la relación entre la toxicidad mediada por la α -sinucleína y el estrés nitrosativo en levadura y lo validaron posteriormente en neuronas.

Por último, las levaduras humanizadas pueden emplearse también para el descubrimiento de moléculas activas que sean capaces de eliminar el efecto que el gen humano ocasiona en levadura, aplicación que se desarrollará en el siguiente epígrafe.

5.3. Levaduras humanizadas para el descubrimiento de moléculas con aplicación terapéutica en patologías humanas

Además de presentar gran utilidad para el análisis funcional y genético *in vivo* de proteínas heterólogas, las levaduras humanizadas son un sistema ideal para la identificación de compuestos químicos capaces de interferir con la proteína expresada y modificar el efecto que ésta ocasiona en la levadura. Los bioensayos en levadura son fáciles de automatizar para la realización de rastreos a gran escala de colecciones de compuestos (*High-throughput screening*, HTS). Este tipo de rastreos están generalmente basados en la detección de crecimiento en medio líquido en placas multipocillo en presencia de un compuesto capaz de revertir la inhibición causada por la expresión de la diana heteróloga. Existen numerosos ejemplos de compuestos hallados o validados en levaduras humanizadas. Perkins *et al.* (2001) lograron reproducir en levadura la actividad de compuestos inhibidores de las poli-ADP-ribosa polimerasas 1 y 2 (PARP-1 y PARP-2) y, con ello, detectar nuevas moléculas con potencial actividad antitumoral que

eliminaban la inhibición de crecimiento que ocasionaba la expresión de estas proteínas. Recientemente han sido validados también diversos compuestos que inhiben la agregación de la proteína β -amiloide (Lopez *et al.*, 2012) y la toxicidad de la α -sinucleína en levadura (Tardiff *et al.*, 2013).

Sin embargo, la realización de bioensayos farmacológicos en levadura, bien sea en levaduras humanizadas o en levaduras que expresan proteínas heterólogas de patógenos, puede presentar algunos obstáculos. *S. cerevisiae* presenta una gruesa pared celular escasamente permeable al paso de compuestos químicos; además cuenta con una serie de transportadores ABC (*ATP binding cassette*), presentes en la membrana plasmática, que expulsan compuestos desde el medio intracelular por un mecanismo dependiente de ATP, actuando como bombas de destoxificación. Ello dificulta que se alcancen elevadas concentraciones intracelulares de estos compuestos en este organismo (Prasad y Goffeau, 2012). Para tratar de minimizar este tipo de problemas, se han generado cepas en las que los principales transportadores (Pdr5 y Snq2) (Kolaczowski *et al.*, 1998) se han eliminado o que manifiestan una permeabilidad incrementada en la membrana plasmática mediante la alteración de la síntesis del ergosterol (utilizando por ejemplo mutantes *erg6Δ*) (Bard *et al.*, 1978), así como cepas que combinan dichas mutaciones (Zunder *et al.*, 2008). También se han utilizado, por ejemplo, cepas carentes de los factores de transcripción *PDR1* y *PDR3*, que regulan la expresión de las bombas de expulsión de compuestos, en un HTS para la búsqueda de inhibidores de la α -sinucleína (Su *et al.*, 2010). Estas mismas cepas han sido también empleadas en rastreos para la búsqueda de inhibidores de la exoenzima S de *P. aeruginosa*, los cuales podrían ser potenciales antimicrobianos al inhibir este factor de virulencia de la bacteria (Arnoldo *et al.*, 2008).

El considerable éxito obtenido en la aplicación de herramientas y estrategias genómicas de *S. cerevisiae* para el estudio funcional de proteínas relacionadas con enfermedades humanas, así como para el descubrimiento de nuevas dianas y de nuevas moléculas con actividad biológica, pone de manifiesto que esta levadura constituye un modelo experimental idóneo para este tipo de estudios, que puede contribuir al hallazgo de mecanismos de acción y de fármacos con utilidad en clínica.

6. Transducción de señales en *S. cerevisiae*: la ruta de integridad celular

Como todos los organismos eucarióticos, *S. cerevisiae* es capaz de percibir los estímulos extracelulares y responder regulando la expresión de determinados genes necesarios para hacer frente a las condiciones ambientales. Para ello cuenta con rutas de transducción de señales que, de forma general, perciben de manera altamente sensible la presencia de un estímulo en la membrana plasmática y lo amplifican a través de cascadas de señalización intracelular para dar lugar a una respuesta transcripcional. Dentro de estas rutas se encuentran las mediadas por MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), que se caracterizan por presentar un módulo básico de tres quinasas cuya activación se produce secuencialmente por fosforilación (Huang y Ferrell, 1996; Ferrell, 1996). En *S. cerevisiae* existen cinco rutas de MAPKs que regulan distintos procesos celulares en respuesta a diferentes estímulos (Figura 7): la ruta de apareamiento, la de filamentación, la ruta de alta osmolaridad, la ruta implicada en la formación de la pared de la espora y por último, la ruta de integridad celular (Molina *et al.*, 2010; Hamel *et al.*, 2012), a la que nos referiremos a continuación.

6.1. La ruta de integridad celular (CWI)

La pared celular de *S. cerevisiae* es una matriz extracelular que determina la morfología celular y actúa como barrera frente a agresiones mecánicas y físicas, así como a cambios en la presión osmótica en el medio ambiente. Está compuesta por una capa interna constituida por una red de β -1,3-glucano y quitina, que le confiere las propiedades estructurales de elasticidad y resistencia; y una externa de glicoproteínas ricas en manosa, entre las que están altamente representadas las proteínas con anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol), que se secretan desde el medio intracelular (Orlean, 2012). Esta estructura tiene la capacidad de poder remodelarse en condiciones de crecimiento normal de la célula, así como en situaciones de estrés. Para ello la célula cuenta con la ruta de integridad celular (CWI, por *Cell Wall Integrity*), la cual permite la reorganización de la pared celular durante los procesos morfogénicos así como la adaptación celular en respuesta a diversos estímulos externos que dañan dicha estructura. Entre éstos cabe mencionar el estrés térmico, el estrés hipoosmótico, la turgencia en la membrana plasmática, el estrés en el ER, el estrés inducido por agentes químicos y por mutaciones

que impliquen alteraciones en la biogénesis de la pared celular. La estimulación de la ruta CWI tiene la función de promover la reparación de la pared celular y mantener su integridad en dichas condiciones. La activación de esta cascada se lleva a cabo de forma general en sitios de crecimiento polarizado, donde los componentes de esta ruta se ensamblan gracias a la presencia de determinadas proteínas con función de andamiaje (Levin, 2011).

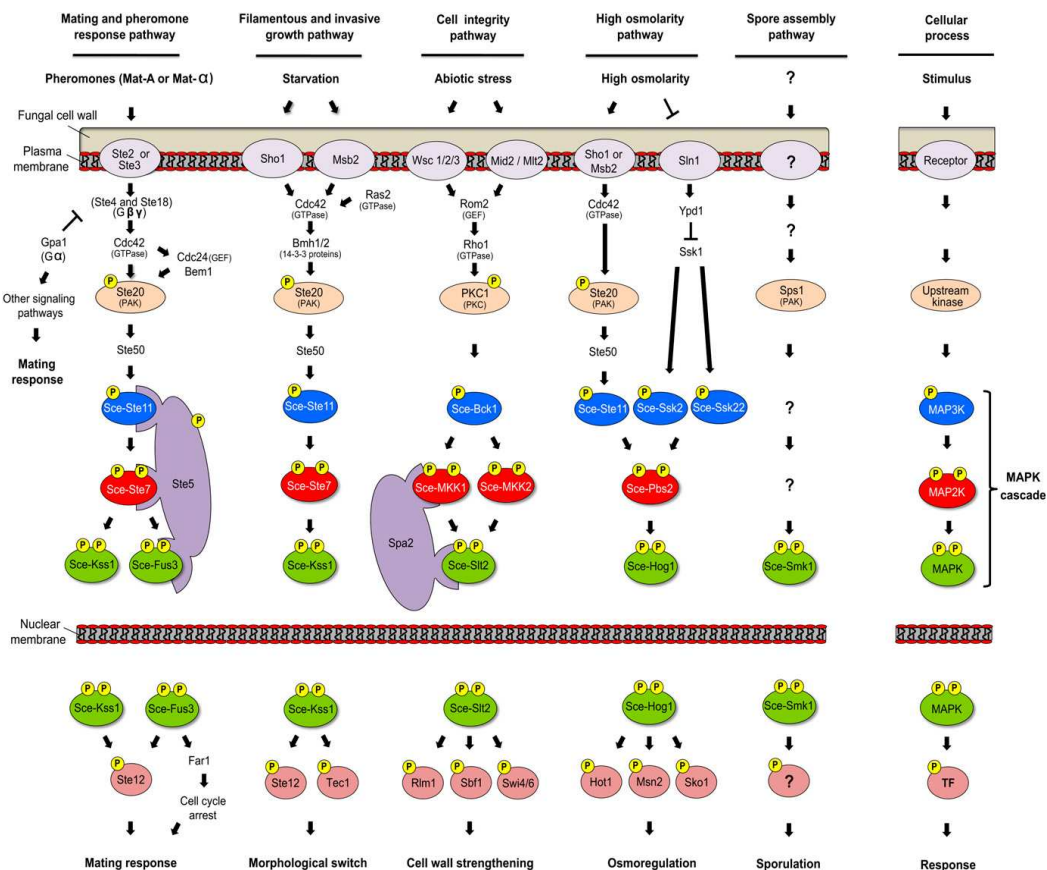


Fig.7. Representación esquemática de las rutas de MAPK en *S. cerevisiae* Tomado de Hamel *et al* (2012).

La ruta se activa a través de cinco sensores: Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 (Jendretzki *et al.*, 2011) (Figura 8). Estos sensores presentan un dominio extracelular rico en serinas y treoninas, un dominio transmembranal a través del cual se anclan a la pared celular y la membrana plasmática y una región citoplásmica. Actúan como mecanosensores que funcionan como “nanomuelles”. Los cambios o agresiones tanto en la pared celular como en la membrana plasmática generan una presión mecánica en los dominios extracelulares que inducen un cambio conformacional que provoca la interacción de las

regiones citoplásmicas con los elementos intracelulares de la ruta (Dupres *et al.*, 2009). De todos los receptores, Wsc1 y Mid2 presentan el papel más importante en la respuesta a las agresiones y estímulos que activan la ruta CWI. Con respecto a la especificidad que manifiestan por el tipo de estímulo que perciben, se ha propuesto que Wsc1 responde principalmente frente a estímulos térmicos (Verna *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1997) y a algunos compuestos que inhiben a la glucán sintasa, como la caspofungina

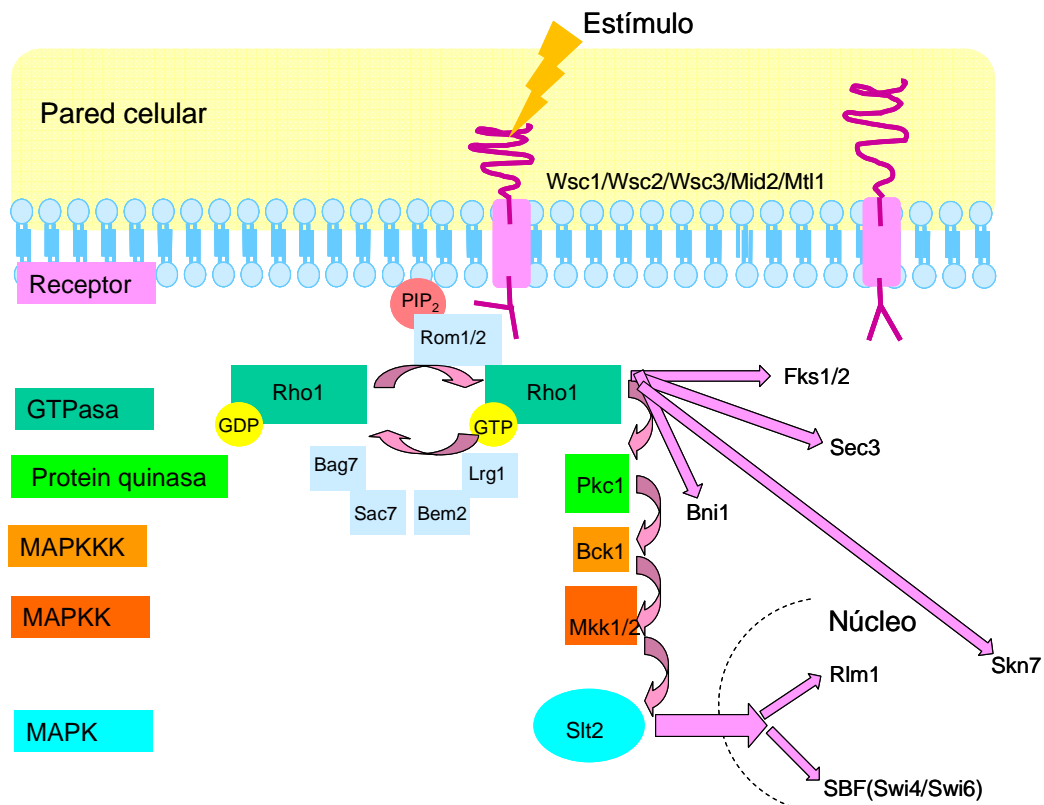


Fig.8. Representación esquemática de la ruta de integridad celular CWI en *S. cerevisiae*.

(Bermejo *et al.*, 2010), mientras que Mid2 transmite la señal mediada por la feromona (Ono *et al.*, 1994) y por los agentes blanco de calcoflúor (Ketela *et al.*, 1999) y rojo Congo (Bermejo *et al.*, 2010). El receptor Wsc1 presenta una localización polarizada en sitios de crecimiento y remodelación de la pared celular, como son las yemas emergentes o el cuello que separa la célula madre y la yema (Delley *et al.*, 1999), mientras que Mid2 se distribuye en la membrana plasmática de forma no polarizada (Straede y Heinisch, 2007). La localización de los receptores está regulada mediante endocitosis. De hecho, cada receptor presenta una señal específica para su

internalización. Esto contribuye a que los receptores se concentren en las zonas donde se requiere su activación (Piao *et al.*, 2007; Wilk *et al.*, 2010).

Cuando Wsc1 y Mid2 son estimulados, su dominio citoplásmico favorece una serie de interacciones moleculares que conducen a la activación de la GTPasa pequeña Rho1 (Figura 8). La transformación de la forma inactiva Rho1-GDP a su estado activo Rho1-GTP es posible gracias a la participación de las GEFs Rom2 (Ozaki *et al.*, 1996), Rom1 y Tus1 (Schmelzle *et al.*, 2002). Rom2 no solo recibe estimulación mediante la formación de un complejo con Wsc1 activo (Philip *et al.*, 2001), sino que también es estimulado por la quinasa Tor2 (Schmidt *et al.*, 1997). Además, Rom2 y su homólogo Rom1 presentan un dominio PH en su extremo C-terminal responsable de su reclutamiento a la membrana plasmática de forma dependiente de la presencia de PtdIns-4,5P₂ (Audhya y Emr, 2002). La inactivación de Rho1 está mediada por cuatro GAPs conocidas como Bag7, Sac7, Bem2 (Schmidt *et al.*, 2002) y Lrg1 (Roumanie *et al.*, 2001). Rho1 es una proteína esencial en *S. cerevisiae* y, además de activar la ruta CWI, presenta numerosos efectores mediante los cuáles controla otros procesos (Bi y Park, 2012). En su estado activo unido a GTP, Rho1 transfiere el estímulo a seis efectores (Figura 8): las glucán sintasas Fks1 y Fks2, a través de las cuales promueve la síntesis del β -1,3-glucano de la pared celular (Qadota *et al.*, 1996; Mazur y Baginsky, 1996); la formina Bni1, que induce la polimerización del citoesqueleto de actina (Kohno *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998); el componente del exocisto Sec3, a través del cual favorece la secreción polarizada (Guo *et al.*, 2001); el factor de transcripción Skn7, que regula la expresión de genes involucrados en la biogénesis de la pared celular (Alberts *et al.*, 1998); y la proteína quinasa C1 (Pkc1), que controla la ruta CWI (Kamada *et al.*, 1996).

Rho1 se localiza en la membrana plasmática en sitios de crecimiento polarizado (Yamochi *et al.*, 1994; Qadota *et al.*, 1996), aunque el mecanismo que dirige su polarización no está muy esclarecido. Su papel como regulador del citoesqueleto de actina es muy complejo. Por un lado se ha descrito su interacción con la formina Bni1, directamente (Kohno *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998), aunque es posible que algunos efectos sobre la regulación de la actina se lleven a cabo indirectamente a través de la activación de su otro efector, Pkc1 (Helliwell *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2003). La exposición de la célula a determinados tipos de estrés produce una despolarización del citoesqueleto de actina mediada por Rho1, efecto que requiere a Pkc1 pero es

independiente de la función de la ruta CWI, mientras que la repolarización posterior depende directamente de dicha cascada de MAPKs (Delley *et al.*, 1999).

Pkc1 es el único homólogo en levadura de la proteína quinasa C de mamíferos (Levin *et al.*, 1990). Es una proteína quinasa C atípica porque, a diferencia del resto de los miembros de la familia de proteínas quinasas C, carece del dominio regulatorio de unión a calcio, y por tanto su actividad es independiente de la presencia de este catión, pero presenta dominios de unión a Rho1 (Antonsson *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994). Se encarga principalmente de fosforilar y así activar el módulo característico de MAPKs de la ruta CWI, pero además presenta otras funciones relacionadas con la regulación del huso mitótico (Khalfan *et al.*, 2000; Hosotani *et al.*, 2001) y la regulación del citoesqueleto de actina a través de la quinasa Tor2 (Helliwell *et al.*, 1998) y de la activación de la formina Bni1 (Dong *et al.*, 2003). Pkc1 se localiza intracelularmente en sitios de crecimiento polarizado (Andrews y Stark, 2000). En las fases G1 y S lo hace en las yemas emergentes o en la parte apical de éstas, al igual que ocurre con Rho1. Durante la fase G2 se despolariza y durante la mitosis se ubica en el cuello entre la célula madre y la yema, para lo cual precisa de una estructura de microfilamentos asociada dicha región, denominada anillo de septinas (Denis y Cyert, 2005).

En la ruta CWI, cuando Pkc1 es activada por Rho1 fosforila a la MAPKKK Bck1 (Lee y Levin, 1992), que a su vez fosforila a las MAPKKs redundantes Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al.*, 1993) y finalmente éstas fosforilan a la MAPK Slt2/Mpk1 (Soler *et al.*, 1995) (Figura 8). Una vez fosforilada, Slt2 es capaz de activar al factor de transcripción Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995) y al complejo dimérico SBF (Swi4/6) (Madden *et al.*, 1997). El factor Rlm1 es el principal regulador de la respuesta transcripcional mediada por la activación de la ruta CWI (García *et al.*, 2004b) mientras que SBF es activado directamente por Slt2 mediante un mecanismo no catalítico (Kim *et al.*, 2008). Uno de los genes regulados por Rlm1 es *MLP1*, el cual codifica una pseudoquinasa llamada Mlp1 (*Mpk-like protein*), para la que se ha descrito que, al igual que Slt2, también es capaz de activar la transcripción a través del complejo SBF (Kim *et al.*, 2008). Estos factores de transcripción son encargados de regular la expresión de genes implicados en la síntesis y reparación de la pared, reorganización del citoesqueleto de actina y redireccionamiento de vesículas secretoras a los lugares de crecimiento polarizado. La regulación negativa de la ruta de integridad

se lleva a cabo por proteínas fosfatasa que desfosforilan a la MAPK Slt2 (Martin *et al.*, 2005).

7. Polaridad celular y citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae*

El citoesqueleto de actina es el elemento estructural clave para el mantenimiento de la polaridad celular en *S. cerevisiae*, la cual es esencial para el crecimiento de la nueva célula emergente en el proceso de gemación en *S. cerevisiae*, así como para la formación de proyecciones en el proceso de apareamiento (*shmoo*s). De forma general, la actina se encuentra en forma monomérica globular (actina-G) y puede polimerizar dando lugar a filamentos de actina (actina-F). La conversión entre ambas formas es un proceso dinámico llevado a cabo por proteínas reguladoras de la polimerización de actina, que promueven su nucleación, como las forminas o el complejo Arp2/3, o su despolimerización, como la cofilina (Campellone y Welch, 2010).

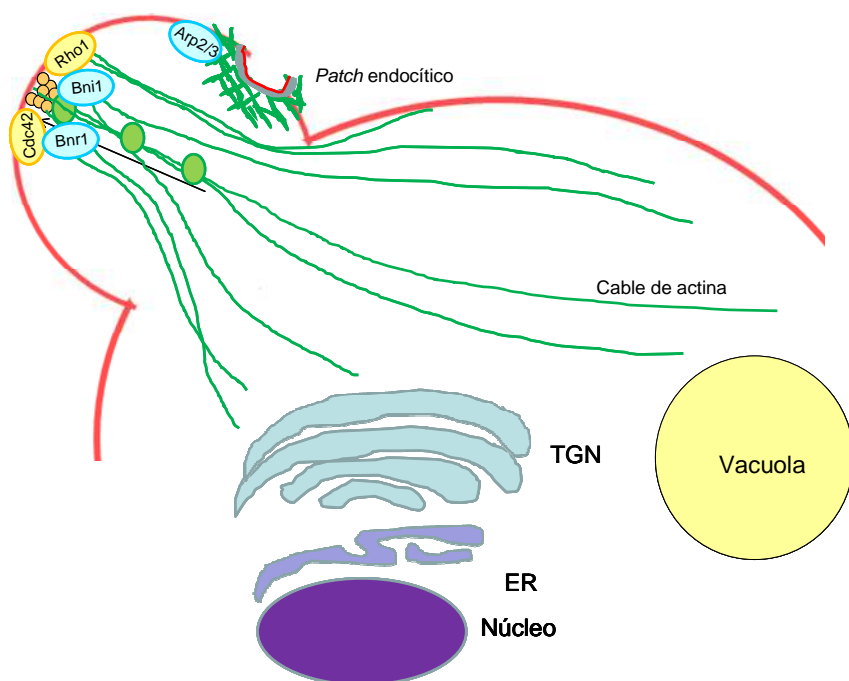


Fig.9. Organización del citoesqueleto de actina en levadura. Las GTPasas Cdc42 y Rho1 se encargan de dirigir la polarización de la célula, de favorecer a través de las forminas la polimerización del citoesqueleto de actina y direccionar el tráfico vesicular a través del citoesqueleto (las vesículas se indican en verde). El citoesqueleto de actina polimeriza por acción del complejo Arp2/3 en forma de *patches* en zonas activas de la membrana donde se produce la endocitosis. La cubierta de clatrina se esquematiza en gris.

Las tres principales estructuras en que se organiza el citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae* son los cables, los *patches* de actina y el anillo de actomiosina (Figura 9). Los primeros son largos haces de filamentos de actina que se orientan en el sentido del eje de crecimiento polarizado y son las vías conductoras a través de las cuales se produce el transporte de vesículas unidireccionalmente hacia el lugar de crecimiento polarizado. Los segundos son estructuras dinámicas que se generan en la membrana plasmática y marcan lugares donde se inicia la endocitosis. El anillo de actomiosina es una estructura contráctil que permite que se lleve a cabo el proceso de citocinesis una vez se ha producido la mitosis (Bi *et al.*, 2012).

El control del citoesqueleto de actina está mediado principalmente por proteínas reguladoras de la polimerización de actina que ejercen su función gracias a su ensamblaje en la membrana plasmática a través de la interacción con los fosfoinosítidos, así como en respuesta a la señal de GTPasas de la familia Rho. En levadura, estas GTPasas son las responsables de mantener la polaridad celular en los momentos de “ruptura de simetría” que tienen lugar en la célula cuando el crecimiento se polariza hacia la yema emergente, si la célula está sufriendo mitosis, o hacia la proyección de apareamiento, si la célula activa el programa de apareamiento en presencia de feromona (Pruyne y Bretscher, 2000; Slaughter *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011). La principal GTPasa que coordina la polaridad en *S. cerevisiae* es Cdc42. A través de sus GEFs, la forma activada de esta proteína (Cdc42-GTP) se concentra en un punto concreto, haciendo así que los cables de actina se orienten específicamente hacia este lugar y la secreción de la célula se polarice en este sentido (Park y Bi, 2007). Tanto Cdc42 como las GTPasas de tipo Rho (Rho1/3/4), también implicadas en el control de la polaridad celular, activan a las forminas Bni1 y Bnr1, que promueven la polimerización de actina (Perez y Rincon, 2010; Bi *et al.*, 2012).

8. Tráfico intracelular de membranas en *S. cerevisiae*

8.1. Endocitosis en *S. cerevisiae*

La endocitosis es el proceso por el cual los componentes de la membrana plasmática así como del medio extracelular son englobados para dar lugar a vesículas citoplásmicas, que se fusionarán con compartimentos endocíticos tempranos, que posteriormente se convertirán en tardíos, bien para ser reciclados y volver nuevamente a la membrana, o

bien para ser degradados en el lisosoma o en la vacuola. Este proceso le sirve a la célula eucariótica para adquirir nutrientes, regular respuestas a estímulos y mantener la composición de la membrana plasmática. La polimerización de actina en determinadas zonas de la membrana, “*patches*”, es esencial para el proceso de internalización endocítica (Figura 9). De hecho, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que la falta de proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina o la inhibición de su polimerización con agentes farmacológicos bloquea el proceso endocítico (Kubler y Riezman, 1993; Geli y Riezman, 1996; Ayscough, 2000). En eucariotas superiores se han descrito numerosas rutas endocíticas; sin embargo, la levadura *S. cerevisiae* solo lleva a cabo la endocitosis mediada por clatrina (*Clathrin-Mediated Endocytosis*, CME), si bien recientemente se ha descrito una vía independiente que podría funcionar de forma residual cuando la endocitosis mediada por clatrina se encuentra bloqueada (Prosser *et al.*, 2011).

La primera etapa en el proceso de endocitosis mediado por clatrina consiste en la unión de cargos extracelulares a receptores en la membrana plasmática. Los receptores unidos al ligando u otras proteínas de membrana que requieran ser endocitadas son secuestrados por proteínas adaptadoras, que acuden de forma precisa a los sitios de iniciación y forman una red en este lugar. La participación de los fosfoinosítidos en el proceso endocítico resulta importante ya que actúan como co-receptores en el reclutamiento y regulación de la maquinaria endocítica en la membrana plasmática. Primeramente se produce la llegada de una serie de proteínas estructurales, como la clatrina, y adaptadoras, como Sla1, Sla2 y End3, que van formando una red que constituye la cubierta (*coat*) de la futura vesícula endocítica. A continuación acuden diversas proteínas que regulan la actividad del complejo de nucleación de actina Arp2/3, lo cual culmina con la formación de un *patch* de actina en el sitio de endocitosis y la aparición de proteínas de unión al citoesqueleto de actina (Figura 9). La polimerización de actina es vital para que se genere la fuerza necesaria para la deformación de la membrana, la fisión de la vesícula de la membrana plasmática y el movimiento de ésta hacia el interior celular. La maquinaria endocítica se desprende de la vesícula endocítica pero las proteínas de unión a actina permanecen con ella (Kaksonen *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2009; Galletta *et al.*, 2010).

Una vez ha tenido lugar la endocitosis, el material englobado se incorpora a una red de orgánulos membranosos intracelulares. En levaduras se distinguen tres tipos principales

de compartimentos relacionados con la ruta endocítica: los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y las vacuolas, que en este organismo son el compartimento degradativo. La dinámica de la ruta endocítica es compleja debido a que el tránsito de los cargos entre unos compartimentos y otros es muy activo (Shaw *et al.*, 2001). Una vez endocitadas, las proteínas de la membrana plasmática pueden tener destinos diferentes (Figura 10). Si deben reciclarse para volver de nuevo a la membrana plasmática, pueden hacerlo directamente de forma rápida desde los endosomas tempranos, a través de

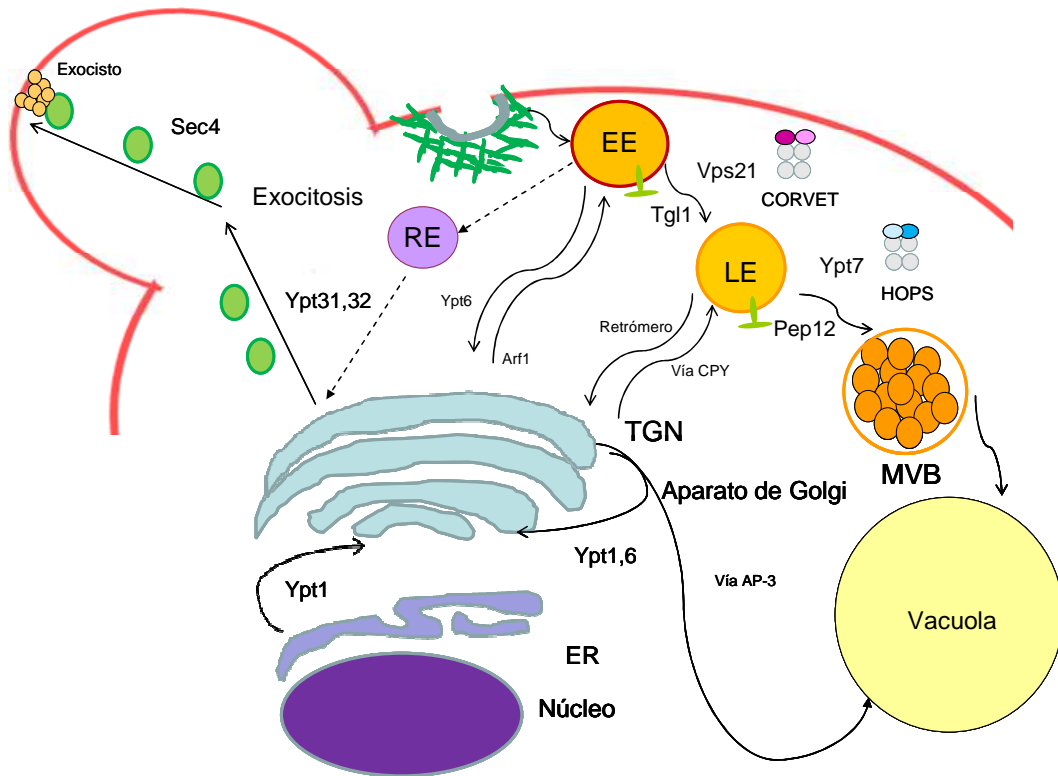


Fig.10. Representación esquemática de las principales rutas en el tráfico endocítico y exocítico en *S. cerevisiae*. Cuando los cargos son endocitados se incorporan a los endosomas tempranos (EE) que se caracterizan por la presencia de la Rab Vps21, la SNARE Tgl1 y el complejo CORVET. Posteriormente éstos maduran dando lugar a los endosomas tardíos (LE) que se caracterizan por la presencia de la Rab Ypt7, la SNARE Pep12 y el complejo HOPS. Antes de fusionarse con la vacuola, estos orgánulos se invaginan dando lugar a cuerpos multivesiculares (MVB). Los EE intercambian tráfico con el TGN, proceso regulado por la Rab Ypt6 y la Arf Arf1; los LE también lo hacen a través del complejo retrómero y de la vía de la carboxipeptidasa Y (CPY); desde los EE se puede producir el reciclaje de cargos a través de endosomas de reciclaje (RE), proceso regulado por las Rab Ypt31/32. Dentro del aparato de Golgi el intercambio con el retículo endoplásmico (ER) está regulado por las Rab Ypt1 e Ypt6. La salida del TGN de los cargos en vesículas que se secretan (coloreadas en verde) se lleva a cabo por las Rab Ypt31/32 y su anclaje a la membrana plasmática está coordinado por la Rab Sec4 y por el exocisto (en amarillo). En los complejos CORVET y HOPS las subunidades accesorias Vps3 y Vps8 o Vps39 y Vps41 se indican en rosa y en azul respectivamente.

los endosomas de reciclaje. No está claro que los endosomas de reciclaje sean entidades distintas de los endosomas tempranos; además, a diferencia de lo que ocurre en células de mamífero, las cuales presentan un eficiente sistema endomembranoso para el reciclaje de moléculas, no existe un amplio conocimiento acerca de estos orgánulos en levadura (Taguchi, 2013). Los endosomas tempranos pueden intercambiar tanto anterógrada como retrógradamente vesículas con el aparato de Golgi. Por lo tanto, se asume que los endosomas tempranos son, además del punto de entrada de las moléculas internalizadas, el primer punto de control de la ruta endocítica.

Los endosomas tempranos que siguen su curso maduran y se convierten posteriormente en endosomas prevacuolares o endosomas tardíos, los cuales controlan el tráfico correspondiente a cargos que pueden ser bien reciclados, bien degradados en la vacuola o bien sintetizados *de novo* por ser proteínas que resultan esenciales para la propia función vacuolar (Figura 10). Los primeros se dirigen al *trans*-Golgi (TGN, de *trans-Golgi Network*), vía el complejo retrómero, desde donde serán secretados a través de la ruta exocítica para poder alcanzar de nuevo la membrana plasmática. Los segundos son incorporados en unas estructuras conocidas como cuerpos multivesiculares que se originan por la invaginación de la membrana de los endosomas prevacuolares hacia el lumen de este orgánulo. Por último, las proteínas de nueva síntesis que pertenecen a la membrana vacuolar permanecen en la membrana de los cuerpos multivesiculares y las enzimas vacuolares, como la hidrolasa vacuolar carboxipeptidasa Y (CPY), que es transportada desde el aparato de Golgi a través de la denominada vía CPY, son vertidas al lumen (Bowers y Stevens, 2005).

En último término los cuerpos multivesiculares se fusionan con la vacuola y su contenido es vertido al lumen vacuolar, donde es degradado por diversas enzimas hidrolíticas. En este proceso, la ubiquitinación juega un importante papel como señal para el reconocimiento de moléculas que deben ser degradadas. Existe también un transporte de cargos directamente desde el aparato de Golgi a la vacuola a través de la vía AP-3. Las proteínas transportadas en la membrana de los cuerpos multivesiculares permanecen en la membrana vacuolar (Lemmon y Traub, 2000).

En general, se puede asumir que en todo proceso que implique un intercambio de membranas a través del tráfico vesicular intracelular existen cuatro etapas: la primera es

la formación de la vesícula, la segunda es el transporte de estas vesículas en la célula, la tercera es el anclaje de éstas a un orgánulo o vesícula de destino y, por último, se produce la fusión de las membranas de las vesículas en tránsito con las de destino. En la primera etapa es necesario que el contenido a transportar sea englobado en una cubierta de proteínas, como la clatrina y los complejos COPI/II. Estas proteínas, además de contribuir a la formación de vesículas, también controlan la incorporación selectiva de los cargos mediante la interacción con dominios específicos que quedan expuestos en las membranas donadoras (Yu y Hughson, 2010). La llegada de las vesículas en las que son transportados los cargos a las membranas de los orgánulos diana es un paso crucial en el tráfico intracelular ya que éstos deben ser ordenados, enviados y anclados eficientemente para ser dirigidos al destino apropiado. Las pequeñas GTPasas de la familia Rab son cruciales en el tráfico de membranas en la célula eucariota y están íntimamente relacionadas con los fosfoinosítidos, y a menudo reguladas por ellos. De hecho, estos lípidos presentan un importante papel en cuanto a que dotan de identidad a las diversas membranas celulares (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012; Liu y Storrie, 2012). Tanto los fosfoinosítidos como las GTPasas Rab son responsables de que la vesícula en tránsito sea reconocida por la membrana diana decuada y dirigida hacia el destino apropiado. En levadura existen 11 GTPasas Rab y todas ellas están implicadas en el tráfico intracelular (Lazar *et al.*, 1997) (Tabla 3). Los homólogos en la levadura de Rab5, regulador del tráfico endosomal temprano en mamíferos, son Vps21, Ypt52 e Ypt53 (Singer-Kruger *et al.*, 1994). De ellos, es Vps21 el que presenta una mayor similitud funcional con Rab5 (Singer-Kruger *et al.*, 1995). Entre los efectores de Vps21 se encuentran la proteína Vac1 y el complejo CORVET (*Class C CORE Vacuole Endosome Transport*) (Tall *et al.*, 1999; Peplowska *et al.*, 2007). Rab7 regula la maduración de los endosomas y su tránsito a la vacuola en mamíferos. En levadura, su homólogo Ypt7 (Wichmann *et al.*, 1992) también actúa a nivel de los endosomas tardíos promoviendo su direccionamiento a la vacuola, así como el tráfico retrógrado de cargos hacia al aparato de Golgi a través del retrómero (Balderhaar *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2010).

En el proceso de anclaje participan una serie de proteínas, que se conocen como factores de *tethering*, que permiten el contacto inicial entre las dos membranas a fusionar y a su vez son efectores de las Rab GTPasas (Cai *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).

Tabla 3. Principales GTPasas implicadas en el tráfico de membranas en *S. cerevisiae*.

Nombre	Homólogo en mamíferos	Proceso que regula	Efectores	Referencias
Vps21/Ypt51	Rab5	Tráfico en los endosomas tempranos	Vac1, CORVET	(Singer-Kruger <i>et al.</i> , 1994; Tall <i>et al.</i> , 1999; Peplowska <i>et al.</i> , 2007)
Ypt52	Rab5	Tráfico en los endosomas tempranos		
Ypt53	Rab5	Tráfico en los endosomas tempranos		
Ypt7	Rab7	Tráfico en los endosomas tardíos, MVB y vacuola	HOPS, complejo retrómero	(Balderhaar <i>et al.</i> , 2010; Cabrera <i>et al.</i> , 2010)
Ypt1	Rab1	Tráfico intra Golgi y desde el ER al Golgi	Complejo COG	(Whyte y Munro, 2001; Suvorova <i>et al.</i> , 2002)
Ypt6	Rab6	Tráfico intra Golgi y tráfico desde endosomas al Golgi	GARP/VFT	(Siniosoglou y Pelham, 2001; Conibear <i>et al.</i> , 2003; Quenneville <i>et al.</i> , 2006)
Ypt31/32	Rab11	Exocitosis de vesículas secretoras del TGN y de endosomas de reciclaje	Myo2, Sec2	(Ortiz <i>et al.</i> , 2002; Lipatova <i>et al.</i> , 2008)
Sec4	Rab4	Fusión de vesículas secretoras en la membrana plasmática	Exocisto	(Guo <i>et al.</i> , 1999)
Arf1	Arf1	Formación de vesículas secretoras en el Golgi hacia endosomas tempranos y tardíos	COP-I	(Nickel <i>et al.</i> , 1998; Lanoix <i>et al.</i> , 1999)

Existen numerosos ejemplos de complejos multiprotéicos que median este anclaje. Por ejemplo, el exocisto, los complejos TRAPI y TRAPII (*transport protein particle*) que actúan en el tráfico desde ER al Golgi o bien intra-Golgi, y los complejos CORVET (*class C COre Vacuole/Endosome Tethering complex*) y HOPS (*HOmotypic vacuolar fusion and Protein Sorting*). Estos dos presentan un papel esencial en la ruta endosomal, en la cual regulan la maduración, integridad y fusión de los endosomas. Estos complejos están constituidos por un *core* formado por cuatro proteínas VPS (*Vacuolar Protein Sorting*) (Nickerson *et al.*, 2009). Estas proteínas fueron aisladas en un rastreo genético en *S.*

cerevisiae en el que se aislaron 41 mutantes en genes defectivos en el tráfico vacuolar de los cuales cuatro presentaron un fenotipo particular consistente en la propia ausencia de vacuolas (Raymond *et al.*, 1992). Las cuatro proteínas codificadas por esos genes, Vps11, Vps 16, Vps 18 y Vps33, se asocian para dar lugar al *core* de los complejos CORVET y HOPS (Sato *et al.*, 2000) (Figura 10). En el caso del primero se asocian además dos subunidades, Vps3 y Vps8; el complejo HOPS, por el contrario, cuenta con Vps39 y Vps41 como subunidades accesorias y se asocian tanto con la GTPasa Ypt7 como con las proteínas SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) para mediar la fusión de las vesículas de los endosomas tardíos/MVB a las vacuolas (Epp *et al.*, 2011).

Las proteínas SNARE son proteínas transmembranales responsables, entre otros factores, de promover la fusión de bicapas lipídicas en la que los cargos procedentes de membranas donadoras se fusionan en el momento y en el compartimento adecuado con las membranasceptoras. Igualmente, estas proteínas regulan la fusión y fisión de vacuolas, que en levadura se produce en respuesta a cambios en el medio ambiente y como mecanismo para la transmisión a la célula hija, lo cual hace que su número, morfología y tamaño varíe constantemente (Wickner, 2010). Las SNAREs se descubrieron en un rastreo de mutantes que presentaban un fenotipo vacuolar fragmentado (VAM) (Wada *et al.* 1992). Se clasifican como R y Q SNAREs dependiendo de si contienen un residuo de glutámico o arginina en una posición determinada en su dominio SNARE, aunque también se las puede agrupar en v-SNAREs y t-SNAREs (*vesicle* y *target*, respectivamente); normalmente R-SNAREs se comportan como v-SNAREs, y Q-SNAREs como t-SNAREs. Las t-SNAREs Tgl1p y Pep12p se ubican respectivamente en compartimentos tempranos y en los endosomas prevacuolares (Prescianotto-Baschong y Riezman, 2002) (Figura 10).

En resumen, tanto la presencia de las GTPasas Rab Vps21 e Ypt7, como de los complejos CORVET y HOPS, las distintas especies de fosfoinosítidos y las proteínas SNARE, determinan en conjunto la identidad de un determinado compartimento en la ruta endocítica. Posiblemente la incorporación selectiva de lípidos y proteínas en los distintos compartimentos contribuya a crear un microambiente que determine la maduración y evolución de cada compartimento en el tráfico vesicular.

8.2. Ruta secretora

8.2.1. El papel del aparato de Golgi en el tráfico de membranas

La ruta secretora está constituida por una serie de orgánulos endomembranosos que funcionan secuencialmente para producir la secreción de proteínas al medio extracelular. Las proteínas sintetizadas *de novo* en el ribosoma se vierten al lumen del ER donde se pliegan adecuadamente y pueden llegar a sufrir una primera modificación postraduccional.

Posteriormente son trasladadas mediante transporte anterógrado al aparato de Golgi, constituido por un conjunto de cisternas membranosas que se dividen en *cis*-, medio o *trans*-, donde las proteínas pueden sufrir una segunda modificación postraduccional. Mientras que este orgánulo en mamíferos está compuesto por cisternas apiladas, en levadura las cisternas son pequeñas y están dispersas a lo largo del citoplasma. El TGN es el centro de control donde las proteínas son destinadas bien a la membrana plasmática (mediante lo que se conoce como exocitosis o ruta secretora) o bien a los orgánulos membranosos de la ruta endocítica degradativa (Figura 10). El tráfico de los cargos desde y hacia el TGN es muy diverso. Como se ha comentado anteriormente, además de enviar cargos hacia los endosomas tempranos, endosomas tardíos o vacuolas, también recibe tráfico de cargos desde el endosoma temprano y desde el tardío, vía el complejo retrómero, que asimismo pueden ser secretados a la membrana plasmática. Además existe un flujo de transporte de cargos que contienen proteínas propias de ER de manera retrógrada desde el aparato de Golgi al ER, para que éstos retornen a su sitio de origen (Sengupta y Linstedt, 2011).

Al igual que sucede en el tráfico endocítico, la secreción es un proceso que implica el transporte de una vesícula a una membrana diana y para ello se requiere de factores que confieran especificidad en el anclaje de la vesícula. El aparato de Golgi está enriquecido en PtdIns-4P. Éste se sintetiza en la levadura a partir de la fosforilación del PtdIns catalizada por la fosfoinosítido 4-quinasa Pik1, homóloga de las PI4K de mamíferos (Flanagan *et al.*, 1993). Al igual que en otros compartimentos celulares, la presencia del PtdIns-4P junto con Arf1 y las Rab GTPasas del TGN favorece el reclutamiento de efectores y permite la posterior segregación de los cargos hacia su correcto destino (Santiago-Tirado y Bretscher, 2011). La familia de pequeñas GTPasas

Arf coordina el transporte de cargos de manera retrógrada y anterógrada en el aparato de Golgi (Tabla 3). En levaduras la activación de la GTPasa Arf1 en el Golgi promueve la formación de vesículas de tipo COP-I hacia los endosomas tempranos y tardíos (Nickel *et al.*, 1998; Lanoix *et al.*, 1999); dicha activación está mediada positivamente por su GEF Sec7 localizada en el TGN (Sata *et al.*, 1998). Además las otras cuatro Rab GTPasas también controlan el tráfico a nivel del Golgi en levadura. Ypt1 e Ypt6, homólogas de Rab1 y Rab6 en mamíferos, controlan el tráfico intra-Golgi, y desde el ER al Golgi o desde endosomas al Golgi, respectivamente (Liu *et al.*, 2012) (Figura 10; Tabla 3). Las Rab GTPasas Ypt31/32 son dos proteínas con una elevada similitud entre ellas y equivalentes a Rab11 en células superiores. Ésta regula el transporte de cargos desde el Golgi a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje en células de mamífero (Ullrich *et al.*, 1996; Mammoto *et al.*, 1999; Schonteich *et al.*, 2008). Ypt31/32 se localizan en el TGN donde regulan la salida de vesículas secretoras (Benli *et al.*, 1996; Jedd *et al.*, 1997) y la exocitosis de las mismas mediante su interacción con la miosina Myo2 (Lipatova *et al.*, 2008). Asimismo, como se ha comentado en el apartado anterior, se ha propuesto el papel de este par de proteínas en el reciclaje de proteínas desde el endosoma temprano a través del TGN (Figura 10), mediante la interacción con la proteína F-box Rcy1, la cual es un componente de los complejos ubiquitín ligasa (Chen *et al.*, 2005; Furuta *et al.*, 2007).

8.2.2. Exocitosis polarizada

La secreción o exocitosis polarizada es el proceso final de la ruta secretora mediante el cual las vesículas secretoras transportadas a lo largo del citoesqueleto de actina alcanzan determinadas zonas de la membrana plasmática, se anclan a ellas y se fusionan a ésta liberando su contenido (Figura 10). Es un proceso esencial para una gran variedad de funciones de la célula eucariótica, tales como crecimiento, morfogénesis y migración celular. Como ya se ha mencionado, en *S. cerevisiae* la exocitosis polarizada permite el crecimiento de la yema gracias a la llegada a ésta de vesículas secretoras conteniendo nuevo material sintetizado. Por lo tanto es un proceso regulado temporalmente en el ciclo de división celular (He y Guo, 2009).

En el anclaje de vesículas secretoras a la membrana plasmática juega un papel esencial el exocisto (Figura 10). Se trata de un factor de *tethering* multiproteico conservado evolutivamente y descubierto por primera vez en levadura, que está formado por ocho

proteínas esenciales en *S. cerevisiae*: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84. El exocisto se localiza en el extremo de la yema emergente durante su crecimiento o en la zona de separación entre la célula madre y la hija en el momento de la septación y separación celular, es decir, en las zonas donde el crecimiento y la expansión de la pared celular se producen de una forma activa (Lipschutz y Mostov, 2002; Hsu *et al.*, 2004; Liu y Guo, 2012). Los distintos componentes del complejo emplean distintos mecanismos para acceder a esta zona. Mientras que la mayoría de ellos emplean los cables de actina para dirigir su polarización en la célula, Sec3 y Exo70 lo hacen reconociendo tanto señales de polaridad como la presencia de fosfoinosítidos en la membrana plasmática, lo cual promueve la interacción con el resto de los componentes que llegan en las vesículas secretoras (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

La GTPasa Rab que dirige la fusión del exocisto con la membrana plasmática en *S. cerevisiae* es Sec4 (Figura 10; Tabla 3). Sec4 es esencial para todos los eventos de tráfico vesicular que transcurren una vez que los cargos a secretar han abandonado el TGN (Guo *et al.*, 1999). Tras el anclaje de las vesículas, los componentes del exocisto interaccionan con complejos SNARE y las vesículas secretoras se fusionan a la membrana plasmática (Grote *et al.*, 2000), liberando su contenido hacia el exterior.

9. Funciones de los fosfoinosítidos en *S. cerevisiae*

En la levadura *S. cerevisiae* existen solo cinco de las siete especies de fosfoinosítido (Figura 1), cuya síntesis y metabolismo queda recogida en la Figura 11. La distribución de estos fosfoinosítidos y su contribución a las funciones celulares esta conservada en este organismo modelo de célula eucariótica (Figura 12). Es decir, el PtdIns-3P controla el tráfico endocítico y el PtdIns-3,5P₂ es importante en la vía endocítica degradativa. La síntesis de PtdIns-3P se lleva a cabo por la PI3K de Clase III Vps34. A partir de este sustrato la PtdIns-3P 5-quinasa Fab1 sintetiza el PtdIns-3,5P₂. Estas enzimas no son esenciales, pero su falta conlleva la aparición de fenotipos relacionados con defectos en el tráfico endocítico y la morfología vacuolar, entre otros (Strahl y Thorner, 2007).

En levadura, el PtdIns-4P se sintetiza por tres enzimas distintas (Figura 11); las principales son Stt4, que actúa a nivel de la membrana plasmática, y Pik1, en el aparato de Golgi, ambas esenciales. La tercera, Lsb6, se localiza tanto en membrana plasmática como en la membrana vacuolar y su falta no ocasiona un fenotipo aparente (Han *et al.*,

2002). Los reservorios de este fosfoinosítido generado en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi presentan funciones diferentes en la célula (Audhya *et al.*, 2000). El PtdIns-4P del aparato de Golgi posee un papel esencial en la ruta secretora; de hecho una mutación termosensible en el gen *PIK1* ocasiona la inhibición del transporte desde el Golgi a la membrana plasmática, así como a la vacuola (Walch-Solimena y Novick, 1999; Hama *et al.*, 1999). Se ha descrito que la interacción de la quinasa Pik1 con la proteína Sec7 promueve la formación de PtdIns-4P de manera coincidente con la activación de la GTPasa Arf1 (Figura 10, Tabla 3), que facilitaría el reclutamiento específico de efectores para el control del tráfico de vesículas en el Golgi (Gloor *et al.*, 2010). El PtdIns-4P de la membrana plasmática presenta un importante papel en la señalización celular en levadura. Las primeras evidencias de su participación en señalización se basaron en el hecho de que el fenotipo de sensibilidad a estaurosporina que presenta un mutante *stt4* (*STaurosporine and Temperature Sensitive*) era rescatado por la sobreexpresión de Pkc1 (Yoshida *et al.*, 1994a). El hallazgo de interacciones genéticas entre Stt4 y diversos componentes de la ruta CWI confirmó su papel en la señalización mediada a través de Pkc1 (Audhya *et al.*, 2002). Con respecto al PtdIns-4,5P₂, como ya se ha comentado, está relacionado con numerosos eventos que

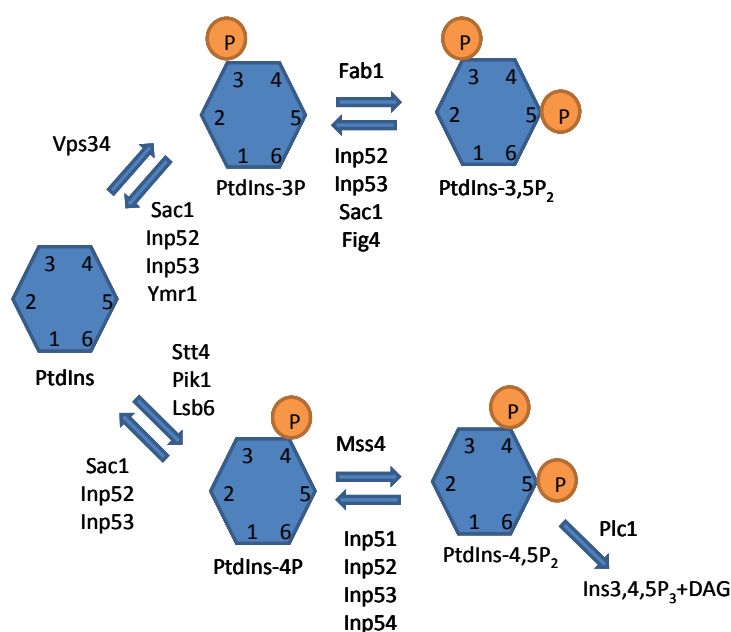


Fig.11. Reacciones bioquímicas que dan lugar a las cinco especies de fosfoinosítidos que existen en levadura a partir de su precursor, el PtdIns. Las posibles rutas de interconversión entre ellos se indican con flechas. Las quinazas implicadas en cada reacción se indican sobre las flechas y las fosfatasas debajo de ellas. Adaptado de Casamayor *et al.* (1999).

transcurren en la membrana plasmática de la célula eucariótica. Sin embargo, *S. cerevisiae* carece de PI3K de Clase I, por lo que no existe PtdIns-3,4,5P₃ ni tampoco PtdIns-3,4P₂ (Figura 11).

En levadura los niveles de fosfoinosítidos están regulados por siete polifosfoinosítido fosfatasa que eliminan diferentes fosfatos en los fosfoinosítidos, y que se agrupan en tres clases en función de sus dominios catalíticos (Hughes *et al.*, 2000; Strahl *et al.*, 2007): las primeras presentan un dominio catalítico similar al de la fosfatasa Sac1 (Sac1, Fig4, Inp51/Sjl1, Inp52/Sjl2 e Inp53/Sjl3); las segundas presentan un dominio catalítico con similitud al de PtdIns-5-fosfatasa que desfosforilan sustratos fosforilados en posición 5' y son algunas de las anteriores, Inp51/Sjl1, Inp52/Sjl2, Inp53/Sjl3, y además Inp54, las cuales además de presentar un dominio de este tipo también contienen un dominio Sac1; la fosfatasa Ymr1 constituye el tercer grupo, y presenta similitud con la miotubularina de mamífero. Como se puede ver en la Figura 11, muchas de estas proteínas presentan una función redundante en levadura, aunque parece que Sac1

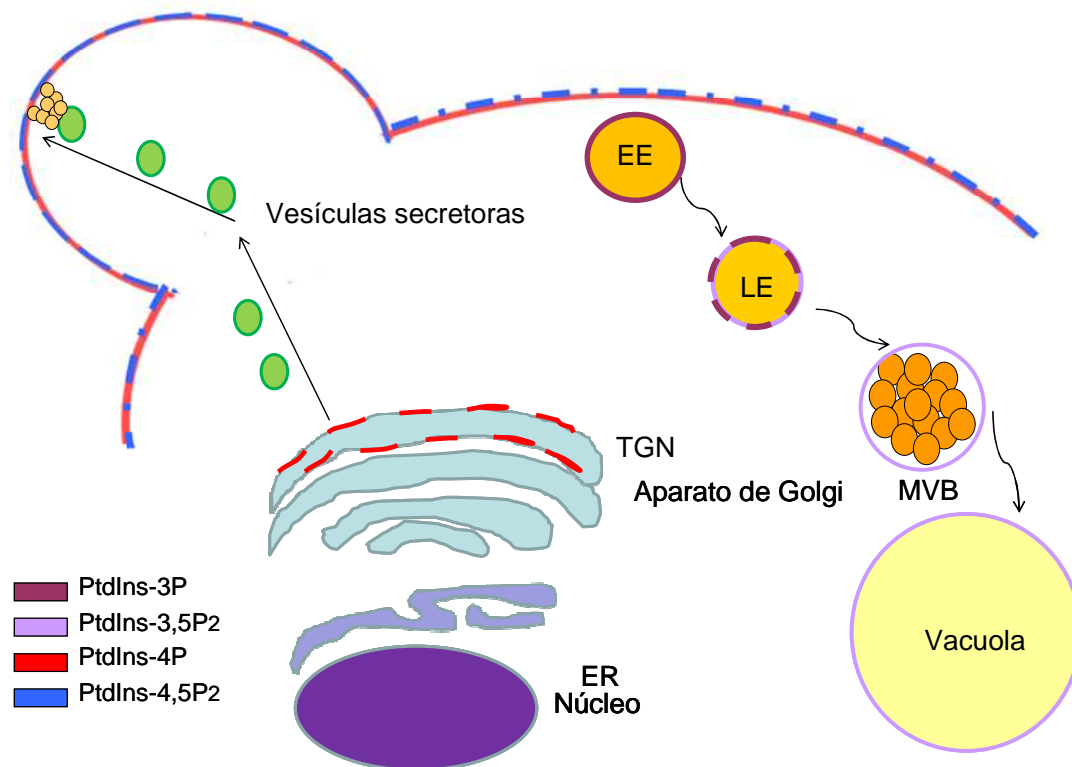


Fig.12. Distribución de los fosfoinosítidos en la célula de levadura.

actúa preferentemente sobre PtdIns-4P (Foti *et al.*, 2001) y las PtdIns-5-fosfatasa sobre PtdIns-4,5P₂ (Ooms *et al.*, 2000). En cuanto a la implicación funcional de estas proteínas se ha relacionado a Sac1 con defectos en la organización del citoesqueleto de actina (Cleves *et al.*, 1989) y con la integridad de la pared celular (Tahirovic *et al.*, 2003), y a Fig4 con la emisión de proyecciones para llevar a cabo el apareamiento (Erdman *et al.*, 1998). Con relación a las PtdIns-5-fosfatasa, ninguna de las cuatro son esenciales pero los dobles mutantes presentan defectos en el crecimiento, en la organización del citoesqueleto de actina y en la endocitosis (Stolz *et al.*, 1998a; Stefan *et al.*, 2005), y el triple mutante *inp51/inp52/inp53* es inviable (Srinivasan *et al.*, 1997; Stolz *et al.*, 1998a).

De entre todos los fosfoinosítidos, el PtdIns-4,5-P₂ participa de forma clave en la biología y la señalización celular de la célula de levadura a través de la regulación de numerosos procesos celulares. Ello es posible gracias a la interacción con numerosas proteínas efectoras a través de dominios específicos, lo que contribuye a la formación de complejos asociados a la membrana plasmática, así como al mantenimiento de unos niveles determinados de este fosfoinosítido, regulados de forma muy precisa por las enzimas responsables de su síntesis y su degradación. Sin embargo, a pesar del conocimiento que se ha alcanzado sobre su función y regulación aún se desconocen aspectos de los procesos en los que participa.

En *S. cerevisiae* el PtdIns-4,5P₂ es sintetizado en la membrana plasmática por la PtdIns-4P 5-quinasa Mss4 (*Multicopy Suppressor of Stt4*) (Desrivieres *et al.*, 1998) a partir de la conversión de su precursor, el PtdIns-4P generado en la membrana plasmática por Stt4 (Figura 11) (Yoshida *et al.*, 1994a; Cutler *et al.*, 1997). El gen *MSS4* es esencial para la levadura y fue aislado como supresor de un mutante termosensible de la proteína Stt4 (Yoshida *et al.*, 1994b). Los reguladores negativos principales de los niveles de este fosfoinosítido son, como ya se ha comentado, las PtdIns 5-fosfatasa Inp51/Sjl1, Inp52/Sjl2, Inp53/Sjl3 e Inp54 (Stolz *et al.*, 1998b).

Las funciones ejercidas por el PtdIns-4,5P₂ en la célula de levadura se han determinado a partir de los estudios realizados con mutantes en el gen *MSS4* que expresan versiones termosensibles de la proteína a temperaturas restrictivas. De esta manera se ha establecido una relación directa de la regulación que ejerce este segundo mensajero sobre la organización del citoesqueleto de actina, tal como sucede en las células

eucariotas superiores (Desrivieres *et al.*, 1998; Homma *et al.*, 1998; Audhya *et al.*, 2000; Audhya *et al.*, 2004). Muchas de las proteínas que están relacionadas funcionalmente con Mss4 son proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, como Cap1, Cap2 o Slm1, o de la polaridad celular, como Spa2, Bem4 y Myo5 (Audhya *et al.*, 2004).

Existen numerosas evidencias de que el PtdIns-4,5P₂ resulta importante a distintos niveles de la endocitosis mediada por clatrina en la célula de levadura, al igual que sucede en eucariotas superiores. Por un lado hay varias proteínas de la maquinaria endocítica que contienen dominios de unión a este fosfoinosítido y cuya función se ve comprometida cuando se anula esta interacción, dado que es la responsable de su reclutamiento. Tal es el caso de las proteínas adaptadoras AP180 (Yap1801/Yap1802), las epsinas Ent1p/Ent2p y la proteína Sla2, las cuales contienen dominios amino terminales ENTH/ANTH, que se unen al PtdIns-4,5P₂, (Aguilar *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha descrito que la proteína Arf3 modula los niveles de este fosfoinosítido para facilitar el proceso endocítico (Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2008). Además, como se ha comentado previamente, el PtdIns-4,5-P₂ controla la actividad de numerosas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, por lo que también contribuye de forma determinante en la formación de *patches* en los sitios de endocitosis. Por último, existen estudios que demuestran que los niveles de este mensajero en la membrana plasmática son determinantes para que el proceso de la internalización y la escisión de la vesícula se lleven a cabo adecuadamente (Sun *et al.*, 2007). La eliminación del PtdIns-4,5-P₂ de las membranas internalizadas por las PtdIns-5 fosfatasas favorece la disociación de los factores y proteínas adaptadoras de la endocitosis (Stefan *et al.*, 2005).

La presencia de PtdIns-4,5P₂ también resulta determinante para marcar la polaridad celular en *S. cerevisiae* en distintos procesos. La interacción de los componentes del exocisto Sec3 y Exo70 con este fosfoinosítido promueven el anclaje de las vesículas secretoras a los sitios de polaridad (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). También se ha descrito su participación como determinante de polaridad en los procesos de señalización que tienen lugar en el apareamiento (Garrenton *et al.*, 2006; Garrenton *et al.*, 2010).

ANTECEDENTES

Y OBJETIVOS

1. Reconstrucción de la ruta oncogénica integrada por PI3K, PTEN y Akt (PKB) en la levadura *S. cerevisiae*

Nuestro equipo ha desarrollado un modelo de levadura humanizada en el que ha sido reconstruida mediante expresión heteróloga la ruta oncogénica integrada por PI3K, PTEN y Akt (PKB), cuyos componentes están ausentes de forma natural en *S. cerevisiae* (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). El estudio de esta ruta resulta viable en este sistema, ya que la expresión de sus componentes de forma aislada o en combinación ocasiona un efecto biológico apreciable.

La expresión de la subunidad catalítica p110 α silvestre de PI3K en la levadura *S. cerevisiae* no ocasiona ningún efecto aparente. Sin embargo, la fusión a una señal de prenilación (p110 α -CAAX) que la dirige constitutivamente a la membrana plasmática donde es accesible a su sustrato, el PtdIns-4,5P₂, causa la inhibición total del crecimiento de la levadura. Esta inhibición del crecimiento es dependiente de la actividad catalítica de PI3K, es decir de la conversión del PtdIns-4,5P₂ en PtdIns-3,4,5P₃, dado que el mutante catalíticamente inactivo que porta la mutación K802R (p110 α -CAAX^{K802R}) no inhibe el crecimiento. La expresión de una versión mutante hiperactiva de la proteína que contiene la mutación oncogénica H1047R (p110 α ^{H1047R}) también produce un defecto en el crecimiento de la levadura, incluso en ausencia de señal de prenilación (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009). Dicho efecto inhibitor es también reversible por la fosfatasa PTEN, que cataliza la reacción inversa y regenera el PtdIns-4,5P₂. De acuerdo con ello, la mutación que anula su actividad fosfatasa evita este efecto de recuperación de crecimiento (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005).

La expresión en levadura de cualquiera de las tres isoformas del principal efector de PI3K, la proteína quinasa Akt, no tiene efectos aparentes. Sin embargo, en presencia de la subunidad catalítica p110 α silvestre, que ejerce un efecto activador sobre Akt, tiene lugar la inhibición del crecimiento (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009). Al igual que lo señalado anteriormente, la fosfatasa PTEN consigue revertir la inhibición de crecimiento también en esta situación, al convertir el PtdIns-3,4,5P₃ de nuevo en PtdIns-4,5P₂ (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009). La toxicidad que origina Akt1 en levadura depende tanto de su actividad catalítica como de su reclutamiento a la membrana por parte del PtdIns-3,4,5P₃. Así, la co-expresión de la subunidad catalítica p110 α silvestre con un

mutante catalíticamente inactivo de Akt que contiene la mutación K179M (Akt1^{K179M}) o con mutantes en residuos esenciales en su dominio PH, no causan ningún efecto en levadura (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009).

Por otra parte, la inhibición del crecimiento que ejerce la expresión de PI3K en levadura se puede rescatar con compuestos inhibidores de esta proteína, como comprobó nuestro equipo de investigación utilizando el inhibidor comercial de PI3K LY294002 (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005).

Por lo tanto, nuestro modelo de levadura humanizada puede ser utilizado con el objeto de llevar a cabo el estudio funcional de las proteínas que se expresan y, además, resulta aplicable a la búsqueda de compuestos que inhiban la actividad de esta ruta, la cual, como se ha descrito en la introducción, presenta un papel central en el cáncer.

2. Empleo del sistema de levadura humanizada mediante expresión heteróloga de PI3K como herramienta para el estudio de la función que desempeña el PtdIns-4,5P₂ en *S. cerevisiae*

Trabajos preliminares realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la expresión de PI3K (p110α-CAAX) en *S. cerevisiae* provoca un incremento de la forma fosforilada de la MAPK Slt2, una despolarización tanto de los *patches* de actina en la yema como del anillo de septinas presente en el cuello de separación entre la yema y la célula madre, y una alteración del transporte endocítico, como consecuencia de la eliminación del PtdIns-4,5P₂ en la membrana de la levadura (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Aunque la función de este segundo mensajero en la endocitosis y en regulación del citoesqueleto de actina en la célula de levadura ha sido objeto de otros estudios (Desrivieres *et al.*, 1998; Homma *et al.*, 1998; Audhya *et al.*, 2000; Audhya *et al.*, 2004), sin embargo, en cuanto a su papel en los procesos de señalización en levadura, solo existen algunas evidencias que sugieren su participación en la ruta CWI, como ya se ha mencionado en la introducción. Por ejemplo, se sabe que el reservorio de PtdIns-4,5P₂ generado por Mss4 a partir de PtdIns-4P participa en el reclutamiento a la membrana de Rom2, la GEF de Rho1 (Audhya *et al.*, 2002). Tampoco se conoce en profundidad la implicación de este lípido en el tráfico intracelular en *S. cerevisiae*. El modelo de levadura humanizada generado supone una herramienta ideal para profundizar en el estudio de la activación

de la ruta CWI mediada por expresión heteróloga de PI3K y ampliar el conocimiento acerca de las posibles funciones que el PtdIns-4,5P₂ puede desempeñar, en diversos procesos celulares que tienen lugar en la levadura.

Por lo tanto, los objetivos que se plantean en el presente trabajo son:

1. Utilización de la levadura humanizada que expresa la ruta constituida por PI3K (p110 α) y Akt como bioensayo en levadura para la detección de compuestos inhibidores de estas proteínas oncogénicas.

1.1. Validación y optimización del bioensayo con inhibidores conocidos de PI3K(p110 α) y Akt

1.2. Rastreo a gran escala de colecciones de extractos microbianos para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad frente a estas proteínas.

2. Estudios de relación estructura-actividad de la subunidad catalítica p110 α de PI3K en el modelo de levadura humanizada mediante mutagénesis dirigida.

3. Empleo del sistema de levadura humanizada con PI3K como herramienta para el estudio de la función que desempeña el PtdIns-4,5P₂ en *S. cerevisiae*.

3.1. Efectos sobre la endocitosis y tráfico intracelular.

3.2. Estudio de la activación de la ruta CWI.

3.3. Estudios transcriptómicos y rastreos genómicos.

MATERIALES Y

MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados

Tabla 4. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

NOMBRE	GENOTIPO	FUENTE O REFERENCIA
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
YPH499	<i>MATa; ade2-10; trp1-63; leu2-1; ura3-52; his3-Δ20; lys2-801</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
YMM1	Isogénica BY4741; <i>RLM1::6MYC::LEU2</i>	(Marin <i>et al.</i> , 2009)
MML550	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1^Y; PKC1-GFP::kanMX4</i>	(Vilella <i>et al.</i> , 2005)
Y03951	Isogénica a BY4741, <i>snq2Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y01784	Isogénica a BY4741, <i>wsc1::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y05241	Isogénica a BY4741, <i>mid2::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y04700	Isogénica a BY4741, <i>rom1::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y05280	Isogénica a BY4741, <i>rom2::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y01328	Isogénica a BY4741, <i>bck1::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y00993	Isogénica a BY4741, <i>slt2::kanMX4</i>	EUROSCARF
OHNY	<i>MATa; ura3; his3; trp1; leu2; ade2</i>	Y. Takai
HNY21	<i>MATa ura3 his3 trp; leu2; ade2; rho1-104</i>	Y. Takai
DLY35	<i>MATa; his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 SEC7-GFP(S65T)::kanMX4</i>	(Aoh <i>et al.</i> , 2011)
HSK13-2A	<i>MATa; ura3-52; leu2-3 112; his3-11,15; SLG1-GFP::kanMX4</i>	(Wilk <i>et al.</i> , 2010)
IR561	Isogénica a YPH499, <i>vip1Δ::kanMX4</i>	I. Rodríguez-Escudero
YPA129	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 PKC1::HIS3</i>	P. Arias
GY2284	<i>MATa; leu2-3, 112, ura3-52, EXO84-GFP::URA3</i>	W.Guo
GY2285	<i>MATa; leu2-3, 112, ura3-52, EXO70-GFP::URA3</i>	W.Guo
GY2286	<i>MATa; leu2-3, 112, ura3-52, SEC3-GFP::URA3</i>	W.Guo
GY2287	<i>MATa; leu2-3, 112, ura3-52, SEC5-GFP::URA3</i>	W.Guo
GY2288	<i>MATa; leu2-3, 112, ura3-52, SEC6-GFP::URA3</i>	W.Guo

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo se recogen en la Tabla 4. Además de ellas, se utilizó la colección completa de mutantes EUROSCARF en los que los 4840 ORFs no esenciales de levadura se encuentran delecionados con la *cassette KANMX4*, que confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418), y que son isogénicos a la cepa silvestre BY4741.

La única cepa de *Escherichia coli* empleada fue DH5α F'[K12Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1* (Φ80/*lacZ_M15*)F'].

2. Medios de cultivo de microorganismos y condiciones de crecimiento

El medio general empleado para el cultivo de *S. cerevisiae* fue YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa), tanto en medio líquido como en sólido (2% de agar). Para mantener la selección de las células que portaban un plásmido se empleó medio mínimo sintético (SD) (0,17% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 0,5% de sulfato de amonio y 2% de glucosa) suplementado con una mezcla de aminoácidos a excepción de los correspondientes a las auxotrofías que eran complementadas por los plásmidos. Los medios SG y SR contenían 2% de galactosa o 1,5% de rafinosa, respectivamente, en lugar de glucosa. La temperatura de incubación rutinaria fue de 30°C. Cuando se trabajó con mutantes termosensibles las células se cultivaron a 24°C hasta el momento de inducir la expresión de la versión termosensible de la proteína por incubación a 38°C durante 90 minutos.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de *E. coli* fue LB (*Luria Bertani*) (1% de bacto-triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 0,5% de NaCl). Cuando fue necesario, se añadió a este medio ampicilina a una concentración de 100 µg/ml con el fin de seleccionar los clones resistentes. La temperatura de incubación fue de 37°C.

3. Técnicas de biología molecular.

Para las técnicas de biología molecular básicas, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), extracción de DNA plasmídico de *E. coli* mediante lisis alcalina, digestión con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, etc. se utilizaron los protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1993).

La amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un *MiniCycler PTC-150 (MJ Research)* utilizando las condiciones adecuadas en cada caso. La visualización del DNA se realizó en geles de agarosa al 1%, preparados en tampón TAE (Tris Acetato 0,04M, EDTA 0,1mM), que eran teñidos posteriormente con una solución del agente intercalante Gel-Red y se observaban en un transiluminador de luz UV *MiniLumi (DNR Bio-imaging systems)*. La elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó utilizando el kit comercial *Gene-Clean (Q-BIOgene-BIO101*

systems). Las enzimas de restricción, la DNA-ligasa y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) procedían de *Roche Diagnostics*.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. La secuencia reconocida por las enzimas de restricción está marcada en negrita.

NOMBRE	SECUENCIA (Secuencia 5'→3')	UTILIDAD
Fw SphI-Ste2 Rv BamHI-Ste2	ACAT GCAT GCGTATCCGCTAAGAATTTAAG CGGGATCCTAAATTATTATTATCTTCAGTCC	Amplificar la secuencia codificante de la proteína Ste2 precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor
Fw BamHI-mCherry Rv EcoRI-mCherry Fw FLAG	GGGGATCCCCGGGGTGAGCA GGGAATTCCTTACTTGACAGCTCGTC CGGGATCCATGGACTACAAGGACG	Amplificar la secuencia codificante de la proteína fluorescente mCherry Amplificar los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de subunidad catalítica p110α de PI3K de <i>Homo sapiens</i> fusionada en posición 5'a la secuencia del epítipo FLAG
Fw MYR	CGGGATCCATGGGAAGCAGCAAGAGC	Amplificar los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de subunidad catalítica p110α de PI3K fusionada en posición 5' a una secuencia de miristoilación
Fw MUT-MYR	CGGGATCCATGGCAAGCAGCAGCAAGAGC	Amplificar los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de subunidad catalítica p110α de PI3K fusionada en posición 5'a una secuencia de miristoilación mutada
Rv PI3K-XbaI	GCTCTAGAGTTCATTTAACAGAGAAGCAATTTGGG	Amplificar los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de subunidad catalítica p110α de PI3K
Fw BAM MUT Rv BAM MUT	GTGTGCTCTCTTGGGTTCTCTAGAGTCGACCT AGGTCGACTCTAGAGGAACCTCAAGAGAGCACAC	Mutagénesis del punto de corte <i>BamHI</i> que existe en el MCS del vector YCpLG-PI3Kα-CAAX en posición 3' con respecto a la secuencia codificante de PI3K
Fw Xba Rv Xba	GCTCTCTTGGGTTCTCTGGAGTCGACCTGCAGGCA TG CATGCCTGCAGGTCGACTCCAGAGGAACCTCAAGAG AG	Mutagénesis del punto de corte <i>XbaI</i> que existe en el MCS del vector YCpLG-PI3Kα-CAAX en posición 3' con respecto a la secuencia codificante de PI3K
Fw RBD Rv RBD	GTAATTGCTGAAGCAATCAGGGAAAAAAGTCAAGT ATGTTGC GCAACATACTTCGAGTTTTTCCCTGATTGCTTCAGCA ATTAC	Introducción de la mutación K227E en el dominio RBD de la subunidad catalítica p110α de PI3K en el plásmido YCpLG-PI3Kα-CAAX
Fw C2alpha Rv C2alpha-	TGCCTTTCCATTTGTTCTGTTGCAGCGGGTGCAGAGG AACACTGTCCATTGGCCTGG CCAGGCCAATGGACAGTGTTCTCTGCAGCACCCGCT GCGCCTGCAACAGAACAAATGGAAGGCA	Introducción de las mutaciones K410A, R412A, K413A y K416A en el dominio C2 de la subunidad catalítica p110α de PI3K en el plásmido YCpLG-PI3Kα-CAAX
Fw PI3K-Stop Rv PI3K-Stop	GCAGCATGCTTTGAAGTAAAGTGTGTGCTCTCTTG CTCAAGAGAGCACACACTTTCAGTTCAAAGCATGCT	Introducción de un codón sin sentido en la subunidad catalítica p110α de PI3K, al final de la secuencia codificante y previamente a la secuencia de la señal de prenilación de los plásmidos YCpLG-PI3Kα-CAAX C2 y YCpLG-PI3Kα-CAAX RBD
Fw H1047R Rv H1047R	CAATGAATGATGCACGCCATGGTGGCTGGACAAC GTTGTCCAGCCACCATGGCGTGATCATTCATTTG	Introducción de la mutación H1047R en la subunidad catalítica p110α de PI3K en los plásmidos YCpLG-PI3Kα C2 y YCpLG-PI3Kα RBD
PI3K0	CACGGAGGCATTCTAAAG	Secuenciación de la subunidad catalítica p110α de PI3K
PI3K1	AAGGCCTCCTCAAGACXATCATCAG	Id.

PI3K2	TCTGTGTTTTAGAATATC	Id.
PI3K3	TTATTC CATGCAGGAC	Id.
PI3K4	GGGTATAAATAGTGCAC	Id.
PI3K5	AGTCCACACAGTCACCG	Id.
PI3K6	GTTCAAAGCATGCTGCTT	Id.
PI3K7	GATGGACAACTGTTTCATATAG	Id.
PI3K1900	CCTAATTCAGCTAGTACAGGTAC	Id.
PI3Kalfa500	TCCTCCAAATGTAGAATCTT	Id.
PI3KSEC	GAGCAAATGAGGCGACCAG	Id.
Fw Anp1 Rv Anp1	ACATGCATGCTGTTGGTTTAATCAATTGC CGGGATCCGTTTCTATCAGGGTGC	Amplificación de la secuencia codificante del gen <i>ANP1</i> precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor
Fw Cherry PstI Rv Cherry PstI Fv CherryPstMUT Rv CherryPstMUT	AAAACTGCAGTTACTTGACAGCTCGTCG AAAACTGCAGGGGAGTCGGTGCAGGCGC CCAGGACTCCTCCCTACAGGACGCGAGTTC GAACTCGCCGTCCTGTAGGAGGAGTCCTGG	Amplificación de la secuencia codificante para la proteína fluorescente mCherry Mutagenizar el punto <i>PstI</i> que contiene la secuencia codificante para la proteína fluorescente mCherry en el plásmido pCR2.2-TOPO-mCherry
Fw Snf7 Rv Snf7	ACATGCATGCTCGTCGGAAATCAGTATT CGGGATCCAAGCCATTTCTGCTTG	Amplificación de la secuencia codificante del gen <i>SNF7</i> precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor
Fw HindIII Rho1 Rv BamHI Rho1	CCCAAGCTTACCTCATCTGTGAGGTTGGG CGGGATCCCTATAACAAGACACACTTCTTC	Amplificación de la secuencia codificante del gen <i>RHO1</i> precedida por una secuencia de ~500 nucleótidos de su propio promotor
Fw Mut Xba Rv Mut Xba	CATAGAACTTTAAAAATTATTCTAGAAAGATGTCACA ACAAGTTG CCAACTTGTTGTGACATCTTCTAGAATAATTTTAAA GTTCTATG	Introducción mediante mutagénesis dirigida un punto de corte <i>XbaI</i> justo antes del comienzo de la secuencia codificante de <i>RHO1</i>
Fw Cherry Xba Rv Cherry Xba	GCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAG GCTCTAGACTTGACAGCTCGTCCATG	Amplificación de la secuencia codificante de mCherry
Fw ACT_F_BIS Rv ACT_R_BIS	ACGAAAGATTCAGAGCCCCA GCAGATTCCAAACCCAAAACA	Amplificación del gen <i>ACT1</i> mediante PCR cuantitativa
Fw ARO10 Rv ARO10	CGACGTTATGTCTTGAAATGG CTTTCGTCGAAGTCTCCGA	Amplificación del gen <i>ARO10</i> mediante PCR cuantitativa
Fw PRM10 Rv PRM10	TTCAAGTGCCATCTGGTATTGC GCAACCCAGACAACAACGAA	Amplificación del gen <i>PRM10</i> mediante PCR cuantitativa
Fw YIL117C Rv YIL117C	AGACATAAGGAAACCCGCAAAAA ACGATTACGCTACCATCACTTTCT	Amplificación del gen <i>PRM5</i> mediante PCR cuantitativa
Fw YHR097C Rv YHR097C	GTCAGTCCACCCAAGGAA AGCTTGTTGCCGGTGTTC	Amplificación del gen <i>YHR097C</i> mediante PCR cuantitativa

Tabla 6. Plásmidos empleados y generados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE REFERENCIA	O
YCpLG	Vector de expresión en levaduras centromérico que contiene la secuencia del promotor <i>GAL1</i>	J. Thorner	
YCpLG-PI3K α -CAAX	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Bos taurus</i> fusionada en 3' a la secuencia de una señal de prenilación	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)	
YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Bos taurus</i> fusionada a la secuencia de una señal de prenilación con la mutación K802R que anula su actividad catalítica	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)	
YCpLG-SigD	Contiene la secuencia codificante para el efector bacteriano de <i>Salmonella</i> SigD/SopB.	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2006)	
YCpLG-PI3K α -CAAX C2	Plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX portando las mutaciones K410A, R412A, K413A y K416A en el dominio C2 de la subunidad catalítica de PI3K p110 α	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α -CAAX RBD	Plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX portando la mutación K227E en el dominio RBD de la subunidad catalítica de PI3K p110 α	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica p110 α de <i>Bos taurus</i>	(Andres-Pons <i>et al.</i> , 2007)	
YCpLG-PI3K α C2	Plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX C2 que carece de la señal de prenilación en carboxi terminal porque se ha generado un codón de terminación mediante mutagénesis dirigida antes de dicha secuencia	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α RBD	Plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX RBD que carece de la señal de prenilación en carboxi terminal porque se ha generado codón de terminación mediante mutagénesis dirigida antes de esta secuencia	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α (H1047R)	Plásmido YCpLG-PI3K α portando la mutación oncogénica H1047R en su dominio quinasa	(Andres-Pons <i>et al.</i> , 2007)	
YCpLG-PI3K α (H1047R) C2	Plásmido YCpLG-PI3K α C2 al que se le ha introducido mediante mutagénesis dirigida la mutación oncogénica H1047R	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α (H1047R) RBD	Plásmido YCpLG-PI3K α RBD al que se le ha introducido mediante mutagénesis dirigida la mutación oncogénica H1047R	Este trabajo	
Flag-p110 α	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en 5' a la secuencia del epítipo FLAG	(Sun <i>et al.</i> , 2011)	
Myr-p110 α	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en 5' a una secuencia de miristoilación	(Sun <i>et al.</i> , 2011)	
Mut-myr-p110 α	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en 5' a una secuencia de miristoilación inactivada por mutación	(Sun <i>et al.</i> , 2011)	
pGEMt-FLAG-PI3Kh0-1900	Inserción del producto de PCR que contiene los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en posición 5' a la secuencia del epítipo FLAG al que se han añadido los puntos de corte <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I en el vector pGEMt	Este trabajo	
pGEMt-Myr-PI3Kh0-1900	Inserción del producto de PCR que contiene los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en posición 5' a una secuencia de miristoilación a la que se han añadido los puntos de corte <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I en el vector pGEMt	Este trabajo	
pGEMt-MutMyr-PI3Kh0-1900	Inserción del producto de PCR que contiene los 1900 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de la subunidad catalítica de PI3K p110 α de <i>Homo sapiens</i> fusionada en posición 5' a una secuencia de miristoilación mutada a la que se han añadido los puntos de corte <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I en el vector pGEMt	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α *	Plásmido YCpLG-PI3K α en el que se ha mutagenizado el punto de corte <i>Bam</i> HI que existe en el MCS del YCpLG en posición 3' con respecto a la secuencia codificante de PI3K	Este trabajo	
YCpLG-PI3K α **	Plásmido YCpLG-PI3K α * en el que se ha mutagenizado el punto de corte <i>Xba</i> I que existe en el MCS del YCpLG en posición 3' con respecto a la secuencia codificante de PI3K	Este trabajo	

YCpLG-FLAG-PI3KαQ	Sustitución de los primeros 1900 nucleótidos de PI3K en el plásmido YCpLG-PI3Kα** mediante la inserción en los sitios <i>BamHI/XbaI</i> que existen en esta zona del producto de PCR clonado en el vector pGEMt-FLAG-PI3K0-1900	Este trabajo
YCpLG-Myr-PI3KαQ	Sustitución de los primeros 1900 nucleótidos de PI3K en el plásmido YCpLG-PI3Kα** mediante la inserción en los sitios <i>BamHI/XbaI</i> que existen en esta zona del producto de PCR clonado en el vector pGEMt-Myr-PI3K0-1900	Este trabajo
YCpLG-MutMyr-PI3KαQ	Sustitución de los primeros 1900 nucleótidos de PI3K en el plásmido YCpLG-PI3Kα** mediante la inserción en los sitios <i>BamHI/XbaI</i> que existen en esta zona del producto de PCR clonado en el vector pGEMt-MutMyr-PI3K0-1900	Este trabajo
pYES2	Vector de expresión en levaduras episómico	Stratagene
pYES2-GFP-Akt1	Contiene la secuencia codificante de Akt1 fusionada en 3' a la secuencia codificante para la proteína fluorescente GFP	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)
pYES-GFP-Akt1K179M	Plásmido pYES2-GFP-Akt1 que contiene la mutación K179M que anula su actividad catalítica	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)
pRS315-HA-GFP-cSNC1	Plásmido que contiene la secuencia codificante de la proteína Snc1 precedida por las secuencias del epítipo HA y de la proteína fluorescente GFP	(Robinson <i>et al.</i> , 2006)
pMLP1-lacZ	Contiene una fusión del promotor del gen <i>MLP1</i> al gen que codifica para la β-galactosidasa <i>lacZ</i>	(García <i>et al.</i> , 2009)
pRS426-GFP-2XPH (PLC6)	Contiene dos copias en tándem del dominio PH de la fosfolipasa C δ1 en fusión a la secuencia de la proteína fluorescente GFP	(Stefan <i>et al.</i> , 2002)
pVD67	Contiene una fusión de la secuencia codificante para la proteína Pkc1 a la secuencia codificante de GFP	(Denis <i>et al.</i> , 2005)
pCR2.2-TOPO-mCherry	Contiene la secuencia codificante para la proteína fluorescente mCherry en el vector comercial pCR2.2-TOPO	M.A. Peñalba
pCR2.2-TOPO-mCherry-PstIMUT	Plásmido pCR2.2-TOPO-mCherry que porta una mutación que anula el punto <i>PstI</i> que contiene la secuencia codificante de mCherry.	Este trabajo
pGEMt-Cherry Pst1MUT	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante de la proteína fluorescente mCherry a la que se le han añadido dos puntos de corte <i>PstI</i>	Este trabajo
pVD67-Pkc1-mCherry	Inserción del producto de PCR procedente del vector pGEMt-Cherry <i>PstI</i> MUT en el sitio <i>PstI</i> del plásmido pVD67	Este trabajo
YEPlac112	Vector de expresión en levaduras episómico	(Gietz y Sugino, 1988)
pGEMt-mCherryBamEco	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante de la proteína fluorescente mCherry a la que se le han añadido los puntos de corte <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i>	Este trabajo
YEPlac112-mCherry	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante de mCherry a la que se han añadido los puntos de corte <i>BamHI/EcoRI</i>	Este trabajo
pGEMt-Ste2	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante para la proteína Ste2 precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor al que se han añadido los puntos de corte <i>SphI/BamHI</i> en el vector pGEMt	Este trabajo
YEPlac112-Ste2-mCherry	Inserción del producto de PCR procedente del vector pGEMt-Ste2 en los sitios <i>SphI/BamHI</i> del vector YEPlac112-mCherry	Este trabajo
pGEMt-Anp1	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante de la proteína Anp1 precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor al que se han añadido los puntos de corte <i>SphI/BamHI</i> en el vector pGEMt	Este trabajo
YEPlac112-Anp1-mCherry	Inserción del producto de PCR procedente del vector pGEMt-Anp1 en los sitios <i>SphI/BamHI</i> del vector YEPlac112-mCherry	Este trabajo
pGEMt-Snf7	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante del gen <i>SNF7</i> precedida por una secuencia de ~300 nucleótidos de su propio promotor al que se han añadido los puntos de corte <i>SphI/BamHI</i> en el vector pGEMt	Este trabajo
YEPlac112-Snf7-mCherry	Inserción del producto de PCR procedente del vector pGEMt-Snf7 en los sitios <i>SphI/BamHI</i> del vector YEPlac112-mCherry	Este trabajo
pRS414-dsRED-Vps21	Contiene la secuencia codificante del gen <i>VPS21</i> fusionada en posición 5' a la secuencia de la proteína fluorescente dsRED; la expresión está controlada por el promotor PHO5	(Cabrera <i>et al.</i> , 2013)
pRS415-Vps3-GFP	Contiene la secuencia codificante del gen <i>VPS3</i> fusionada en 3' a la secuencia de GFP; la expresión está controlada por el promotor NOP1	(Cabrera <i>et al.</i> , 2013)
pRS415-Vps8-GFP	Contiene la secuencia codificante del gen <i>VPS8</i> fusionada en 3' a la	(Cabrera <i>et al.</i> , 2013)

	secuencia de GFP; la expresión está controlada por el promotor NOP1	
pRS414-mCherry-Ypt7	Contiene la secuencia codificante del gen <i>YPT7</i> fusionada en posición 5' a la secuencia de mCherry; la expresión está controlada por el promotor TP1	(Lachmann <i>et al.</i> , 2012)
pRS414-dsRED-Pep12	Contiene la secuencia codificante del gen <i>PEP12</i> fusionada en posición 5' a la secuencia de la proteína fluorescente dsRED; la expresión está controlada por el promotor PHO5	(Lachmann <i>et al.</i> , 2012)
pRC647	Expresa la secuencia codificante de la proteína Ypt31 fusionada en 3' a la de GFP bajo el control .	(Buvelot <i>et al.</i> , 2006)
pRC630	Expresa la secuencia codificante de la proteína Ypt31 fusionada en 3' a la de GFP bajo el control .	R. Collins
YCpLac22-GAL	Plásmido en que se ha introducido la secuencia promotora del gen <i>GAL1</i>	I. Rodríguez-Escudero
YCpLac22-GAL-PI3Kα-CAAX	Contiene la secuencia codificante de la subunidad catalítica p110α de PI3K de <i>Bos taurus</i> fusionada en posición 5' a un residuo de prenilación en el plásmido YCpLac22-GAL	I. Rodríguez-Escudero.
pGEMt-Rho1	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia codificante del gen <i>RHO1</i> precedida por una secuencia de ~500 nucleótidos de su propio promotor al que se han añadido los puntos de corte <i>HindIII/BamHI</i> en el vector pGEMt	Este trabajo
pGEMt-Rho1MutXbaI	Plásmido pGEMt-Rho1 en el que se ha introducido mediante mutagénesis dirigida un punto de corte <i>XbaI</i> justo antes del comienzo de la secuencia codificante de <i>RHO1</i>	Este trabajo
YCpLac111	Vector de expresión en levaduras centromérico	(Gietz <i>et al.</i> , 1988)
YCpLac111- Rho1	Inserción del producto de PCR procedente del vector pGEMt-Rho1MutXbaI en los sitios <i>HindIII/BamHI</i> del vector YCpLac111	Este trabajo
YCpLac111- mCherry-Rho1	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia de mCherry a la que se añadieron puntos de corte <i>XbaI</i> , en el punto <i>XbaI</i> del plásmido YCpLac111-Rho1	Este trabajo

La introducción de las mutaciones se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida. Para ello se realizó una PCR utilizando una polimerasa de alta procesividad, la *Pfu Turbo* (Stratagene), y se siguieron las especificaciones del kit *QuikChange Site-directed Mutagenesis* (Stratagene). Los oligonucleótidos empleados se diseñaron según estas especificaciones y contenían la mutación deseada. Como molde se usó el plásmido sin la mutación. Tras la reacción de PCR mutagénica, se digirió el producto de PCR con la enzima de restricción *DpnI*, que únicamente digiere DNA metilado, con lo que se eliminó el DNA molde dejando únicamente el sintetizado *de novo*, que contenía la mutación deseada. La secuenciación de DNA fue llevada a cabo por la Unidad de Genómica de la UCM, que cuenta con un secuenciador automático multicapilar *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos empleados para PCR y secuenciación de DNA están descritos en la Tabla 5.

Para la extracción de plásmidos de *E. coli* se empleó el protocolo de lisis alcalina y en ocasiones el kit comercial *Qiaquick Plasmid Mini-Kit* (Qiagen). Para la lisis alcalina se recogió mediante centrifugación a 13000 rpm durante 1 minuto un volumen de 3 ml de

cultivo que había sido cultivado durante 18 horas en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. El sedimento se resuspendió en 100 µl de solución de lisis I (glucosa 50mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25mM pH 8); a continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis II (NaOH 0,2N, 1% de SDS); por último se añadieron 150 µl de solución de lisis III (29,4 % de acetato potásico y 11,5% de ácido acético glacial). Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C durante 20 minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y por último se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en agua bidestilada y desionizada MilliQ. Cuando se precisaron mayores cantidades de DNA plasmídico se empleó el *Qiaquick Plasmid Midi-Kit* (Qiagen).

Para transformar *E.coli* se siguió el protocolo de Hanahan (1983), es decir, 100 µl de células competentes se incubaron durante 30 minutos en hielo con 1 µl de DNA plasmídico o con 10 µl de DNA de una reacción de ligación o de mutagénesis dirigida de un plásmido. Posteriormente se aplicó un choque térmico durante 90 segundos a 42°C y, se incubó de nuevo en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadieron 4 volúmenes de medio LB y se incubaron durante 1 hora en agitación a 37°C, tras lo cual se sembraron en medio selectivo LB con ampicilina 100 µg/ml a 37°C durante 24 horas. Los plásmidos empleados están descritos en la Tabla 6.

Para transformar las células de levadura se siguió el protocolo convencional de transformación con acetato de litio (Ito *et al.*, 1983); a partir de un preinóculo en YPD se cultivaron las levaduras hasta una DO_{600} de 1. Se centrifugaron 10 ml de cultivo y las células recogidas fueron resuspendidas en una mezcla compuesta por un 40% de polietilenglicol 4000, 0,2M de acetato de litio y 1 µl/ml de β-mercaptoetanol. Se añadió 0,6 mg de DNA y tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células se incubaron en agitación a 45°C durante 30 minutos, tras lo cual se sembraron en placas de medio SD selectivo, en función del marcador auxotrófico del plásmido, que se incubaron 3 días a 30°C para la obtención de transformantes.

4. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas

El efecto sobre el crecimiento de las distintas proteínas que se expresaron de forma heteróloga en levadura se evaluó mediante la siembra de gotas de diluciones decimales

seriadas de una suspensión celular en placas SD o SG que carecían de los correspondientes requerimientos auxotróficos para el mantenimiento de los plásmidos. Para ello, los transformantes se incubaron durante 18 horas en medio selectivo SD. Estos preinóculos se emplearon para preparar una nueva suspensión en agua estéril a DO_{600} de 0,5. Se depositaron 5 μ l de cada suspensión y de tres diluciones decimales seriadas de las mismas en la superficie de las placas de agar SD, como control de crecimiento, y SG, para inducir la expresión de los genes regulados por el promotor *GAL1*. El crecimiento se observó de 48 a 72 horas después de su incubación a 30°C.

5. Ensayos de recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs)

Para medir la viabilidad celular en células expresando p110 α -CAAX se llevaron a cabo ensayos de recuento de UFCs. Las células transformadas con los plásmidos YCpLG-PI3K α -CAAX o YCpLG-PI3K α (K802R)-CAAX se sembraron en medio SR durante 18h. Posteriormente se añadió nuevo medio SG hasta una DO_{600} de 0,2 y se incubaron durante 8 horas a 30°C en agitación. Teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica de células de levadura equivale a $2 \cdot 10^7$ células/ml, se sembró en medio sólido SD el mismo número de células de cada transformante, y posteriormente se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas. Para calcular la viabilidad celular se realizó el recuento de UFCs. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células expresando YCpLG-PI3K α -CAAX con respecto a la media del número de CFUs que se obtenían en el caso de las células expresando el plásmido YCpLG-PI3K α (K802R)-CAAX, al cual se asignó un 100% de viabilidad. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

6. Ensayos de inhibición en medio líquido

Los transformantes de levadura se sembraron en medio selectivo SR durante 18 horas y posteriormente se diluyeron con nuevo medio de cultivo SR hasta una DO_{600} de 0,05, para los ensayos de inhibición de p110 α , y de 0,1, para los ensayos de inhibición de Akt. 5 μ L de estos cultivos se inocularon en placas de 96 pocillos que contenían 100 μ L de medio SG para producir la expresión heteróloga de las distintas proteínas. Cuando se realizaron estudios de permeabilidad se añadió al medio de cultivo una concentración de 0,003% de SDS. Los compuestos se diluyeron en el medio SG a una determinada concentración y se realizaron diluciones seriadas en base 2. Se emplearon LY294002

(*Echelon*, *Sigma*), 15e (“PI3K α inhibitor II” *Echelon*), PI103 (*Echelon*), ZSTK474 (*Selleckchem*), GDC-0941 (*Selleckchem*), Inhibidor X (*Calbiochem*), inhibidor XI (*Calbiochem*) y tricitiribina (*Calbiochem*); la CMI de estos compuestos se determinó previamente sobre la cepa silvestre BY4741. La DO_{600} se midió a 24, 30, 40 y 48 horas en un espectrofotómetro para placas de 96 pocillos (modelo 680; *BioRad*).

Para normalizar los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición se calculó un ratio de recuperación de crecimiento para cada inhibidor y para cada condición evaluada. Éste se calculó dividiendo la diferencia de DO_{600} después de la incubación menos la DO_{600} antes de la incubación para cada concentración, entre la diferencia de DO_{600} después de la incubación menos la DO_{600} antes de la incubación en ausencia de compuesto.

7. Ensayos de inhibición de halo reverso en medio sólido

Los transformantes se incubaron en medio SR durante 18 horas y posteriormente se diluyeron con medio de cultivo SR hasta una DO_{600} de 0,5. A partir de estas suspensiones, se inoculó una placa de medio sólido SG con una torunda estéril y se colocó en el centro un disco de 6 mm de celulosa que había sido previamente cargado con 15 μ L de una solución concentrada del compuesto disuelto en DMSO. Se dejó difundir y posteriormente se incubó durante 72 horas a 30°C, al cabo de las cuales se midió el halo de crecimiento alrededor del disco. Para evaluar el efecto de agentes surfactantes sobre la permeabilidad de las células de *S. cerevisiae* se añadieron al medio de cultivo SG los detergentes dodecil sulfato sódico (SDS) (*Duchefa Biochemie*), nonil fenoxipoli-etoxietanol 40 (NP-40) (*Fluka*) o Tritón X-100 (*GE Healthcare*) a distintas concentraciones.

8. Rastreo de inhibidores de PI3K

La búsqueda de inhibidores de PI3K se llevó a cabo sobre una colección de extractos de actinomicetos y hongos, disponible en la Fundación MEDINA, que se almacena en placas de 96 pocillos a una concentración arbitraria de 2×*Whole Broth Equivalent* (WBE) en DMSO al 20%. El rastreo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, en las que mediante un equipo pipeteador automático (*Aquarius TECAN*) se dispensaron 5 μ L por pocillo de cada extracto.

Para el rastreo primario, levaduras de la cepa Y03951 (mutante *snq2Δ*) transformadas con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX, se cultivaron durante 18 horas en medio SR. Posteriormente se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,02 con nuevo medio SG con una concentración del 0,003% del detergente SDS. Con un sistema dispensador automático (*Multidrop Thermo*) se añadieron 100 μ l de estos inóculos en cada pocillo. En cada placa se reservaron cuatro pocillos con medio de cultivo y sin inóculo como blanco; otros cuatro pocillos con medio de cultivo y sin extracto se inocularon con levaduras transformadas con el plásmido YCpLG-PI3K α (K802R)-CAAX, para expresar el mutante catalíticamente inactivo de p110 α -CAAX, como control positivo de crecimiento; como control de la toxicidad inducida por p110 α -CAAX, en otros cuatro pocillos con medio de cultivo y sin extracto se inocularon levaduras expresando el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX; como control interno positivo de inhibición de PI3K se empleó el inhibidor LY294002 a las concentraciones de 125, 62,5, 31,25 y 16 μ M en cada placa. En los ensayos de determinación de la especificidad se emplearon levaduras de la misma cepa transformadas con el plásmido YCpLG-SigD que codifica el efector de *Salmonella* SigD/SopB, en lugar de p110 α -CAAX, empleando como controles los mismos que en los ensayos de inhibición de p110 α -CAAX, a excepción del control negativo de crecimiento, que en este caso fueron levaduras expresando el plásmido YCpLG-SigD en ausencia de extracto. Para llevar a cabo los ensayos dosis-respuesta se realizaron diluciones seriadas en base 2 en DMSO 20% de los extractos que habían resultado positivos en los ensayos previos. Posteriormente se añadió el inóculo de levaduras expresando el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX.

Para todos los ensayos se midió la DO₆₀₀ antes y después de las 30 horas de incubación a 30°C, para poder sustraer el valor de absorbancia a tiempo cero que algunos extractos coloreados presentaban. La absorbancia se midió en un equipo *Multi-Detection Microplate Reader Ultra Evolution TECAN*.

Para el procesamiento y análisis de resultados se empleó el programa *Genedata Screener*. La actividad inhibidora de los extractos sobre p110 α -CAAX o sobre SigD/SopB, dependiendo del caso, se expresó como el porcentaje de recuperación de crecimiento, considerando el 100% de crecimiento el de las células expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R}, y el 0% el de levaduras expresando p110 α -CAAX o SigD/SopB en ausencia de extracto. Se consideraron positivos aquellos extractos

que recuperaron el crecimiento de la levadura expresando $p110\alpha$ -CAAX $\geq 75\%$. Estos extractos se volvieron a ensayar para confirmar su actividad y con aquellos extractos confirmados se realizó un ensayo de especificidad. Los extractos cuyo porcentaje de recuperación de crecimiento sobre SigD/SopB fue $\leq 50\%$ se consideraron específicos.

Para determinar la reproducibilidad del ensayo se calculó el coeficiente de determinación r^2 entre dos de las réplicas del ensayo de confirmación. La aplicación *Condoseo* del *Genedata Screener* generó a partir de los datos las curvas dosis-respuesta y, en función del parámetro R^2 , se estableció si las curvas presentaban una correlación adecuada. Los factores Z' y RZ' se calcularon como se describe en Zhang *et al.* (1999) y Kummel *et al.* (2010).

9. Análisis transcripcional mediante *microarrays* de DNA

A excepción de la extracción de RNA, todos los experimentos se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del PTM/UCM.

9.1. Extracción de RNA

Las células de levadura se cultivaron en medio SR durante 18 horas y al cabo de este período se añadió nuevo medio de cultivo SR y galactosa a una concentración final del 2% hasta una DO_{600} de 0,3 para inducir la expresión de genes controlados por el promotor *GAL1*, y se incubaron a 30°C en agitación durante 4 horas. Se recogieron 5 ml de estos cultivos mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C y se extrajo el RNA mediante ruptura mecánica siguiendo las instrucciones del kit *RNeasy MIDI kit* (Qiagen). La concentración del RNA extraído se midió a 260 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (1 DO a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA) y su calidad y perfil de tamaños se comprobó por cromatografía capilar en un cromatógrafo *Bioanalyzer 2100B* (Agilent Technologies). Para cada condición se extrajo el RNA de células de cultivos que procedían de tres transformantes distintos.

9.2. Síntesis, marcaje e hibridación de *microarrays* de DNA

El cDNA de doble cadena se sintetizó a partir de 5 μg del RNA extraído mediante transcripción reversa con el kit *One-cycle cDNA Synthesis Kit* (Affymetrix). Tras su

purificación con el kit *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix), el cDNA se empleó como molde en la reacción de transcripción para generar el cRNA. Para ello se empleó el kit de marcaje *GeneChip IVT Labeling Kit*, el cual emplea análogos de nucleótidos marcados con biotina, que se incorporan al cRNA, de forma que éste queda finalmente marcado. A continuación el cRNA marcado con biotina se purificó empleando de nuevo el *Sample Cleanup Module*. Por último y con objeto de mejorar la sensibilidad en la posterior hibridación con el soporte, se hidrolizó el cRNA en fragmentos de 35 a 200 bases según las instrucciones del kit *Sample Cleanup Module*. La concentración y calidad del cRNA se midieron de nuevo en un espectrofotómetro y cromatógrafo, respectivamente. La hibridación se realizó sobre la plataforma *Affymetrix*, que contiene sondas que representan aproximadamente todos los ORFs de *S.cerevisiae*. El cRNA marcado y disuelto en un cóctel de hibridación, se incubó con el soporte conteniendo las sondas durante 16 horas a 45°C. Transcurridas las 16 horas de incubación, la plataforma se lavó en la estación de fluidos *GeneChip Fluidics Station 450* y se tiñó con un conjugado fluorescente de Estreptavidina-Ficoeritrina, que se une a la biotina del cRNA marcado. Por último, la placa se escaneó y se registraron las señales de fluorescencia emitidas por la ficoeritrina.

9.3. Análisis de imágenes, procesamiento de datos y análisis estadístico

Los valores de intensidad de las señales de fluorescencia obtenidas se convirtieron en valores de expresión génica a través del programa GCRMA (Bioconductor) (Han *et al.*, 2004). Para expresar las diferencias en los niveles de expresión se calculó un ratio que resultó de la media de las señales de fluorescencia de las muestras tratadas dividido entre la media de las señales de fluorescencia de las muestras control. Se consideraron inducidos por expresión de esta proteína aquellos ORFs cuyo ratio fue $\geq 1,7$ y reprimidos aquellos cuyo ratio fue $\leq 0,6$. El análisis estadístico se realizó con el programa Cyber-t (<http://cybert.microarray.ics.uci.edu/>) (Baldi y Long, 2001) que calculó un *p-value* Bayesiano para determinar la significación estadística de los ratios de inducción o represión. Sólo se tuvieron en cuenta para los análisis posteriores aquellos ORFs cuyos valores de señal presentaran un *p value* bayesiano $\leq 0,05$.

9.4. Análisis de resultados

Siguiendo estos criterios, los genes diferencialmente expresados con significación estadística se agruparon funcionalmente en categorías empleando las herramientas bioinformáticas *Genecodis* [<http://genecodis.dacya.ucm.es>, CNB-CSIC, Madrid; (Tabas-Madrid *et al.*, 2012), (Nogales-Cadenas *et al.*, 2009), (Carmona-Saez *et al.*, 2007)], *Go Term Finder* y *Go Slim Mapper* [SGD (<http://www.yeastgenome.org>, Stanford University, CA)]. Además, para determinar la significación estadística de la agrupación funcional se calculó un *p value* de Bonferroni para el porcentaje de genes relacionados con una función determinada en la lista de los diferencialmente expresados, con respecto al total de genes en el genoma relacionados con esa función. Para realizar la agrupación del perfil transcripcional obtenido en condiciones de expresión de p110 α -CAAX con otros similares se empleó el programa *MeV*, seleccionando *clustering* jerárquico y medida de distancias euclidianas [(<http://www.tm4.org/mev>, Dana-Farber Cancer Institute, Boston) (Saeed *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2006)].

Para determinar los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes diferencialmente expresados se empleó de nuevo la herramienta *Genecodis* y para establecer un criterio de selección en el establecimiento de la asociación estadística se procedió al cálculo de un *p value* de Bonferroni de la misma forma que para el establecimiento de grupos funcionales. Se seleccionaron solo aquellos en los que este valor era $\leq 1 \cdot 10^{-9}$.

9.5. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado con los mismos RNAs que los empleados para *microarrays* de DNA. A partir de 2 μ g de los RNAs se sintetizó por transcripción reversa el cDNA mediante el kit *AS Transcription System* (Promega). Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C y finalmente 5 minutos a 4°C. El cDNA se diluyó hasta 1:100 en agua MilliQ. En placas de 384 pocillos y por duplicado con cada cDNA obtenido, se añadieron 4,5 μ L de cDNA, 5 μ L de *Power SYBR Green PCR Master MIX* (Applied Biosystems) y 0,6 μ L de la pareja de oligonucleótidos específicos a una concentración de 5 μ M. Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el programa *Primer Express* y donados por el grupo del Dr. Arroyo

(Departamento de Microbiología II, UCM). Las secuencias para amplificar los genes se encuentran en la Tabla 6.

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en Unidad de Genómica de la UCM en el equipo *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time*. Las condiciones de reacción de PCR fueron un ciclo de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 minutos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Para descartar la presencia de productos inespecíficos en la reacción, se realizó el análisis de curvas de disociación para cada uno de los genes amplificados. La expresión de los resultados obtenidos para cada gen se llevó a cabo normalizando los valores con respecto al gen control *ACT1*, cuya expresión se mantiene constante independientemente de las condiciones experimentales; los ratios de expresión diferencial se calcularon siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001).

10. Detección de proteínas mediante *Western-blotting*

10.1. Obtención de extractos proteicos

Las células de levadura se cultivaron en medio SR durante 18 horas y al cabo de este período se añadió nuevo medio de cultivo SR y galactosa a una concentración final del 2% hasta una DO_{600} de 0,3 para inducir la expresión de genes controlados por el promotor *GAL1*, y se incubaron a 30°C en agitación durante al menos 4 horas, de forma general. Posteriormente se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C y se resuspendieron en tampón de lisis frío (50 mM de TrisHCl pH=7,5, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 0,1% de SDS, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA); además se añadieron extemporáneamente por cada 1 ml, 100 µl de mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA Free, Roche*) y 100 µl de para-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF, *Sigma*) 0,1M. A cada sedimento se añadieron 100 µl de esta mezcla y perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (*Sartorius*); las células se rompieron mediante ruptura mecánica en un agitador de células Fast Prep (FP120/BIO101 *ThermoSavant*) a velocidad 5,5 durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante. La concentración de proteína de los extractos se determinó midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro *Beckman DV 640* a 280 nm (1 unidad de DO_{280} nm corresponde aproximadamente a una concentración de 1 mg/ml de proteína). La concentración de las muestras se igualó mediante adición de la cantidad

que se precisase de tampón de lisis a cada muestra. A continuación se añadió tampón de carga SDS-PAGE 2X (125 mM de Tris HCl pH=6,8, 5% de SDS, 25% de glicerol, una punta de espátula de azul de bromofenol y 200 µl de DTT por cada ml de tampón de carga) a los extractos y se hirvieron durante 5 minutos.

10.2. Electroforesis de proteínas

La separación electroforética de proteínas se llevó a cabo según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los extractos proteicos se cargaron en geles SDS-PAGE de poliacrilamida constituidos por un gel concentrador al 5% y otro separador al 10%. Los geles se colocaron en cubetas *Miniprotean II Cell* (Bio-Rad), con tampón de electroforesis (0,3% de Tris, 1,5% de glicina y 0,1% de SDS) y la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 150 V durante 60 minutos. El patrón de pesos moleculares procedió de *Bio-Rad*.

10.3. Transferencia de proteínas

La transferencia de las proteínas de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (*Hybond, Amersham*) se llevó a cabo en cubetas *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (BioRad) a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora, protegiendo tanto la membrana como el gel con papel *Whatman* 3MM y con dos esponjas. Las cubetas contenían tampón de transferencia (0,58 % de Tris, 0,29 % de glicina y 0,037% de SDS) al cual se añadían extemporáneamente 200 ml de etanol por cada litro de tampón. Para verificar que la transferencia se hubiera efectuado correctamente se tiñeron las membranas con una solución de rojo Ponceau (1% de ácido acético glacial y 0,5% de rojo *Ponceau* disueltos en agua destilada).

10.4. Inmunodetección

La membrana se bloqueó con leche al 5% diluida en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario diluido en una solución de PBS-Tween-20 al 0,1% y 1% de leche, durante 1 hora a temperatura ambiente o 18 horas a 4°C. Se lavó 5 veces con PBS-Tween-20 0,1% y se incubó durante 1 hora en oscuridad con el anticuerpo secundario, conjugado a un fluorocromo (*LI-COR*), diluido en la misma solución que el primario. Tras 5 lavados con PBS-Tween-20 0,1%, las

membranas se escanearon con el escáner *Odyssey* (LI-COR). Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-actina clon C4 (*Inmuno MP Biomedicals*; dilución 1:2000); anti-fosfo p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) (*Cell Signalling*; dilución 1:2000); anti-Slt2 (Martin *et al.*, 1993); dilución 1:2000); Anti-GFP (*Clontech*; dilución 1:1000); anti-fosfo-Akt-Ser473 (*Cell Signalling*; dilución 1:1000); Anti-Myc 4A6 (*Millipore*; dilución 1:1000); anti-G6PDH (Sigma; dilución 1:50000).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-mouse IgG-Alexa FluorR 680, anti-rabbit IgG-IRDyeR 800CW y anti-rabbit IgG-IRDyeR 680; todos ellos de LI-COR y a una dilución de 1:5000.

11. Ensayos β -galactosidasa

Las células de levadura se cultivaron en medio SR durante 18 horas y al cabo de este período se añadió nuevo medio de cultivo SR y galactosa a una concentración final del 2% hasta una OD_{600} de 0,3 para inducir la expresión de genes controlados por el promotor *GAL1*, y se incubaron a 30°C en agitación. Se recogieron por centrifugación 10 ml de cultivo para preparar los extractos proteicos. Posteriormente las células se resuspendieron en 250 μ l de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8,1, 1 mM DTT y 20% de glicerol) y se rompieron mecánicamente mediante la adición de perlas de vidrio (*Glasperlen 1 mm, Sartorius*) y agitación en un sistema Fast Prep (FP120/BIO101 *ThermoSavant*) a velocidad 5,5 durante 30 segundos. Después se midió la concentración proteica de los extractos mediante el método colorimétrico de Bradford. Los ensayos β -galactosidasa se realizaron en placas de 96 pocillos de la siguiente manera. Se incorporaron 10 μ l del extracto a 90 μ l de la mezcla compuesta por tampón Z (1,6% de fosfato disódico heptahidratado, 0,55% de fosfato monosódico monohidratado, 0,075% de cloruro potásico y 0,025% de sulfato magnésico heptahidratado pH 7 y 0,03% de β -mercaptoetanol). Se añadieron 20 μ l del sustrato de la reacción, el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG, 4 mg/ml disuelto en tampón Z). La placa se incubó a 30°C durante el tiempo necesario para observar la aparición de color (como mínimo, 10 minutos). Una vez se hubo producido, la reacción se paró con 50 μ l de carbonato sódico 1M. La absorbancia del producto generado en esta reacción enzimática se midió a 415 nm en un lector para placas multipocillo (modelo 680; *Biorad*). La actividad β -galactosidasa se expresó como nanomoles de ONPG convertidos por minuto y por mg de

proteína (nm/min/mg). Estos experimentos se realizaron por triplicado con tres transformantes distintos, recientemente obtenidos.

12. Microscopía de fluorescencia

De forma general, para la microscopía de fluorescencia sobre células vivas (observación de GFP, mCherry o dsRED), se cultivaron células en medio mínimo SR durante 18 horas. Posteriormente se añadió nuevo medio SG para inducir la expresión de las proteínas reguladas por el promotor *GAL1*, hasta OD_{600} de 0,3 y se incubaron durante 5 horas a 30°C en agitación. Estos cultivos se concentraron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos y se visualizaron en un microscopio *Eclipse TE2000U Nikon*. Las imágenes digitales fueron captadas mediante la utilización de una cámara *Orca C4742-95-12ER (Hamamatsu)* y procesadas con el programa *Aquacosmos 1.3*.

12.1. Tinción del citoesqueleto de actina con rodamina-faloidina

La observación del citoesqueleto de actina en células de levadura se llevó a cabo mediante su tinción con rodamina-faloidina (*Sigma*) según el protocolo de Jimenez *et al* (Jimenez *et al.*, 1998). A partir del momento de la inducción se tomaron muestras de 10 ml de estos cultivos cada hora. Estas muestras se fijaron añadiendo 1/7 del volumen de cultivo de formaldehído al 35-40% durante una hora a 4°C. Posteriormente se lavaron tres veces con tampón 1 (Para 30 ml: 3 ml de KH_2PO_4 1M, 3 ml de $MgCl_2$ 0,1M, 1,5 ml de EGTA 0,2M pH 7,5 y 22,5 ml de agua). A continuación se resuspendieron en 100 µl de dicho tampón con 50 µl de Tritón X-100, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Luego se resuspendieron en 100 µl de una solución de rodamina-faloidina a una concentración de 4 µg/ml (*Sigma*). Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBS, y se procedió a su observación en el microscopio de fluorescencia.

12.2. Tinción con FM4-64

Para monitorizar la endocitosis, se realizó una tinción con el colorante FM4-64 (*Molecular Probes*) siguiendo el protocolo de Vida *et al.* (1995). 5 horas después de inducir la expresión de las proteínas, las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos y se resuspendieron en medio SG con FM4-64 a una

concentración final de 40 μ M. Se incubaron con el colorante a 30°C en agitación durante 15, 30 y 60 minutos, dependiendo del experimento, tras lo cual se observaron al microscopio de fluorescencia.

12.3. Otros tratamientos

Para observar el efecto del tratamiento con Zimoliasa 100T (*ImmunOTM*, MP BIOMEDICALS) se añadió el compuesto a los cultivos a una concentración de 0,8 U/ml en el momento de inducir la expresión de las proteínas con medio SG. Los cultivos se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación.

El tratamiento de los cultivos con Latrunculina B (*Enzo-LifeSciences*) se llevó a cabo añadiendo este compuesto a una concentración de 150 μ M en el momento de inducir la expresión de las proteínas con medio SG. Al cabo de 2 horas se repitió el tratamiento con la misma concentración para reforzar la dosis de compuesto. Las células se incubaron de nuevo y se visualizaron al microscopio 2 horas después.

El tratamiento con el inhibidor 15e se llevó a cabo de forma similar, añadiendo el compuesto inicialmente a una concentración de 90 μ M. Los cultivos se incubaron durante 5 horas antes de ser visualizados.

13. Rastreo a gran escala sobre la colección de mutantes delecionados en genes no esenciales de levadura

La colección de mutantes, distribuida en 75 placas de 96 pocillos se transformó con el plásmido YCpLG-Myr-PI3K α Q siguiendo una variante del protocolo estándar de transformación de levaduras adaptada para placa multipocillo (Gietz y Woods, 2002). La última etapa de este protocolo consistió en resuspender el sedimento de las células que se sometieron al proceso de transformación en medio selectivo SD y desde aquí transferir 5 μ L a nuevas placas multipocillo con medio selectivo SD para favorecer el crecimiento de los transformantes. Éstos se incubaron a 30°C durante 72 horas hasta la aparición de un sedimento en el pocillo de la placa, correspondiente a levaduras que se habían transformado con el plásmido. El sedimento se resuspendió posteriormente y nuevamente se transfirieron 5 μ L a una placa multipocillo con 200 μ L medio SG para permitir la expresión de PI3K. A continuación se introdujo el replicador en la placa que

contenía los transformantes y se sembraron gotas en medio sólido SG. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Tras la incubación se identificó visualmente en qué mutantes se producía un efecto de supresión o de agravamiento del fenotipo. La eficiencia de transformación obtenida en el rastreo primario fue del 89%.

La recomprobación de este efecto se llevó a cabo por duplicado con el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX y con YCpLG-Myr-PI3K α Q siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se descartaron aquellos mutantes en los que no se reprodujo el resultado inicial. En aquellos en que se reprodujo, se verificó por triplicado el efecto de forma individual por crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas.

Para agrupar en categorías funcionales los genes cuya ausencia determinó una supresión o potenciación del fenotipo causado por Myr-p110 α , se empleó la herramienta bioinformática *Genecodis*.

RESULTADOS

1. Optimización de un bioensayo en levadura para la búsqueda de inhibidores específicos de PI3K de clase I

1.1. Inhibidores de PI3K contrarrestan la inhibición del crecimiento causado por la expresión heteróloga de esta proteína

Una de las aplicaciones directas de la levadura humanizada generada por expresión de los componentes de la ruta oncogénica PI3K-Akt es el desarrollo de bioensayos para la detección y el estudio de inhibidores de estas enzimas. Con objeto de poner a punto un bioensayo de estas características analizamos el comportamiento de levaduras expresando diversas combinaciones de p110 α /Akt1 que resultasen tóxicas para la levadura, en presencia de diluciones seriadas de inhibidores comerciales de PI3K. Previamente habíamos demostrado que el tratamiento de levaduras expresando la versión constitutivamente activa p110 α -CAAX con el pan-inhibidor de PI3K LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994), recuperaba el crecimiento como consecuencia de la inhibición de la actividad de esta proteína (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Para realizar los nuevos ensayos de inhibición escogimos, además de p110 α -CAAX expresada individualmente, varias versiones de p110 α (p110 α -CAAX/ p110 α^{H1047R} /p110 α) que en co-expresión con Akt afectaban al crecimiento de la levadura en distinto grado. Esto se manifiesta en los ensayos por una diferente reducción de la OD₆₀₀ del cultivo de las levaduras expresando estas proteínas en ausencia de compuesto en comparación con la que alcanza el cultivo de las levaduras transformadas con vectores vacíos como control de crecimiento (Figura 13A y B). Además, para verificar que los ensayos se realizaban a concentraciones sub-letales de compuesto para la levadura, empleamos transformantes expresando dos vectores vacíos. En estas levaduras control se comprobó que el compuesto no era tóxico para la levadura. Las gráficas muestran que el pan-inhibidor de PI3K LY294002 reduce el crecimiento a concentraciones superiores a 50 μM , mientras que el compuesto 15e, un inhibidor selectivo de la isoforma p110 α (Hayakawa *et al.*, 2006), no es tóxico a concentraciones inferiores a 800 μM . Este control nos permite apreciar el crecimiento máximo que pueden alcanzar las levaduras en estas condiciones.

Cuando levaduras expresando las distintas versiones de p110 α , de forma aislada o en combinación con Akt, se incubaron en presencia de LY294002 se produjo un rescate del crecimiento en el rango de concentraciones comprendido entre 400 y 50 μM , solo en el caso de las que expresaban p110 α -CAAX (Figura 13A). Esto se aprecia porque en estos

cultivos se produce un incremento en los valores de OD₆₀₀ con respecto a los que se alcanzan en ausencia de compuesto, que llegan a alcanzar las células control transformadas con dos vectores vacíos en este rango de concentraciones. Llevamos a cabo este ensayo también con el compuesto 15e que atenuó el efecto tóxico de tres de las cuatro versiones empleadas en el bioensayo (Figura 13B). Este rescate se produjo en un rango de concentraciones más amplio que el que tuvo lugar en presencia de LY294002, y las concentraciones requeridas para ello fueron además inferiores. El efecto inhibitor se manifestó entre 800 y 25 μ M para p110 α -CAAX; entre 800 y 6,25 μ M para p110 α ^{H1047R} en co-expresión con Akt, sosteniéndose un crecimiento elevado incluso a bajas concentraciones; y entre 50 y 6,25 μ M para p110 α en co-expresión con Akt, no siendo en este caso un rescate muy efectivo en comparación con las otras dos versiones citadas. La disminución en la capacidad para recuperar del crecimiento en levaduras que co-expresan p110 α con Akt puede explicarse porque estas levaduras presentan alteraciones en la membrana plasmática (Rodríguez-Escudero *et al.*, comunicación personal), que podrían afectar a la penetración de los compuestos empleados. Al igual que el compuesto LY294002, el compuesto 15e tampoco fue capaz de rescatar el crecimiento de levaduras co-expresando p110 α -CAAX con Akt probablemente porque esta combinación provoca un efecto más severo.

Zunder *et al.* (2008) adaptaron nuestro sistema de levadura humanizada para la detección de inhibidores de PI3K en medio sólido en placas de agar. El “ensayo de halo reverso”, como lo denominaron, se lleva a cabo sembrando sobre una placa de agar un césped de levaduras expresando p110 α -CAAX, sobre el que se deposita un disco de celulosa cargado con el inhibidor de esta proteína; dependiendo de la potencia, estabilidad y capacidad de difusión y toxicidad del compuesto sobre la levadura, se genera alrededor del disco un halo de crecimiento que permite la detección de inhibidores de PI3K de forma visual. Cuando llevamos a cabo el ensayo de halo reverso sobre levaduras expresando p110 α -CAAX con los compuestos LY294002 y 15e (Figura 13C) a las concentraciones respectivas de 10 y 5 mM, se produjo un halo de crecimiento claramente visible en ambos casos, de 18 y 36 mm respectivamente. Ninguno de estos compuestos resultó tóxico a las concentraciones empleadas, como se aprecia en el ensayo de los compuestos sobre levaduras expresando el vector vacío (Figura 13C).

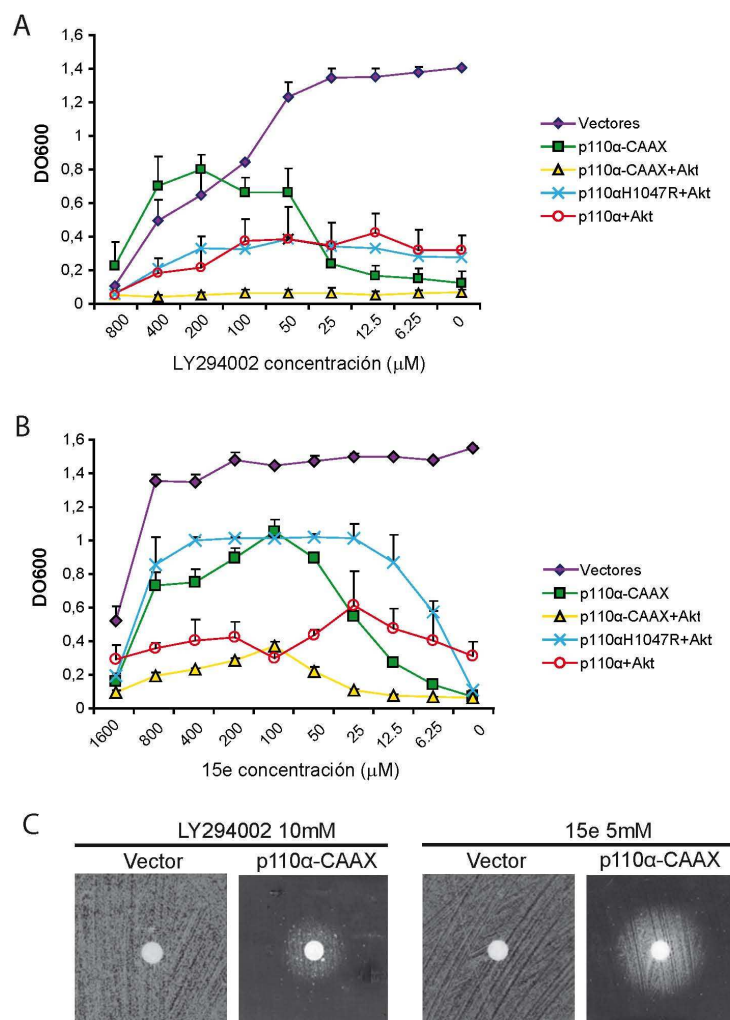


Fig.13. Efecto de diluciones seriadas en medio SG de LY294002 (A) o 15e (B) en levaduras silvestres (cepa BY4741) transformados con dos vectores vacíos (YCpLG y pYES2) como control, o con los mismos vectores conteniendo la subunidad catalítica p110α fusionada a una señal de prenilación (p110α-CAAX), individualmente o junto con un plásmido que expresa Akt1 (p110α-CAAX+Akt1), el mutante oncogénico p110α^{H1047R} junto con Akt1 (p110αH1047R+Akt1) y la versión silvestre de p110α con Akt1 (p110α+Akt1). El crecimiento se midió 30 horas después de la incubación en presencia de los inhibidores y se representó en la gráfica como DO₆₀₀ frente a las concentraciones decrecientes de los compuestos que se emplearon para el ensayo. Las gráficas corresponden a la media de tres experimentos, cuya desviación estándar representan las barras de error. (C) Ensayos de halo reverso en medio sólido SG sembrado con levaduras silvestres (BY4741) transformadas con un plásmido vacío YCpLG (vector) o con el mismo plásmido expresando p110α-CAAX. En el centro de la placa, un disco de celulosa cargado con los inhibidores LY294002 y 15e.

El inhibidor de PI3K 15e resultó, por tanto, más potente que el LY294002 en los ensayos de inhibición realizados tanto en medio líquido como en medio sólido. De todas las versiones de p110α examinadas en el ensayo, la más adecuada para la aplicación del

bioensayo fue p110 α -CAAX, dado que aunque causa una drástica inhibición del crecimiento de la levadura su actividad puede ser bloqueada, como se ha visto, por ambos inhibidores de PI3K en un rango de concentraciones amplio.

1.2. La delección del gen que codifica para el transportador de membrana Sng2 incrementa la sensibilidad del ensayo de inhibición de PI3K en levadura

La levadura *S. cerevisiae* ha sido ampliamente empleada como modelo para la realización de ensayos con moléculas activas, pero la presencia de una gruesa pared celular y una serie de bombas de eflujo en la membrana plasmática dificulta que se alcancen concentraciones intracelulares efectivas para la realización de estos ensayos. Para superar este problema, se han generado cepas en las que los principales transportadores que actúan como bombas de destoxificación se han eliminado o cepas que presentan la síntesis de ergosterol defectuosa, por carecer de alguna de las enzimas implicadas en su biosíntesis (Bjornsti, 2002; Melese y Hieter, 2002; Andrusiak *et al.*, 2012).

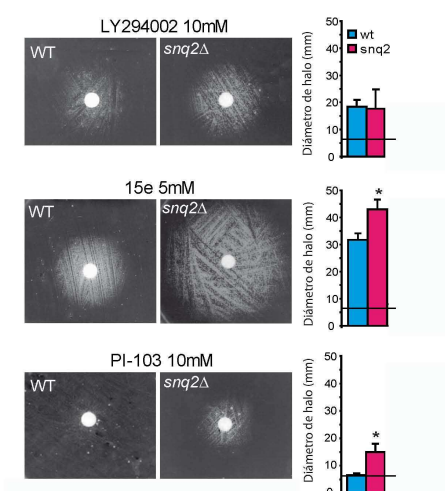


Fig.14. Levaduras de la cepa silvestre BY4741 (WT) y de la cepa isogénica Y03951, carente del transportador Sng2 (*sng2Δ*), expresando en medio sólido SG p110 α -CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX en presencia de un disco de celulosa cargado con los inhibidores de PI3K LY294002, 15e y PI-103 a las concentraciones indicadas. En cada gráfica se representa la media de los diámetros de los halos obtenidos en tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La línea horizontal indica el diámetro del disco de celulosa (6mm). El asterisco (*) indica significación estadística en la prueba T de Student ($p < 0.05$).

Para comprobar si la falta de alguno de estos transportadores permitía una mejor detección del efecto de inhibición de PI3K en nuestro sistema, evaluamos el comportamiento de diversas cepas mutantes carentes de los transportadores de membrana Snq2 y Pdr5, y de Erg6, una enzima que participa en la biosíntesis del ergosterol, con respecto a una cepa isogénica silvestre, en todos los casos expresando p110 α -CAAX. De las tres cepas mutantes, Pdr5 y Erg6 presentaron problemas de crecimiento, por lo que escogimos a Snq2 para llevar a cabo los ensayos de inhibición de forma comparativa con la cepa silvestre; este mutante carece del transportador ABC (*ATP-binding cassette*) Snq2 y presenta un crecimiento equivalente al de la cepa silvestre en nuestras condiciones de análisis. Cuando realizamos el ensayo de halo reverso con el inhibidor 15e sobre el mutante *snq2* Δ se apreció un incremento significativo en el diámetro de halo con respecto a la cepa silvestre, lo cual no sucedió con el compuesto LY294002. El aumento del efecto se volvió a producir cuando empleamos el inhibidor dual de PI3K/mTOR PI-103 (Fan *et al.*, 2006) a la concentración de 10 mM, con el que se apreció claramente un halo de crecimiento en el mutante *snq2* Δ , que prácticamente no se observó en la cepa silvestre. Con estos resultados se puede decir que el empleo de este mutante mejora en general la sensibilidad del ensayo de inhibición de PI3K.

1.3. El empleo de bajas concentraciones del detergente SDS favorece la eficiencia del ensayo de inhibición de PI3K en levadura

S. cerevisiae presenta problemas de permeabilidad al paso de compuestos al medio intracelular. Para favorecer el aumento de concentraciones intracelulares de inhibidores de PI3K en levadura evaluamos la influencia que tiene la presencia de bajas concentraciones de agentes surfactantes en el medio de cultivo en el que se llevan a cabo los ensayos. En el caso de que estos agentes surfactantes ejercieran un efecto detergente sobre la membrana plasmática incrementando su permeabilidad al paso de compuestos inhibidores de PI3K se produciría un incremento en el rescate de crecimiento. Para verificarlo, escogimos tres agentes surfactantes, dodecil sulfato sódico (SDS), nonil fenoxipolietoxietanol (NP-40) y Tritón X-100, y determinamos el diámetro de halo al incubar las células expresando p110 α -CAAX con LY294002 en presencia de distintas concentraciones de estos compuestos en comparación con el diámetro de halo que se obtiene en ausencia de ellos (18 mm). Como se puede ver en la Figura 15, la presencia de concentraciones de SDS entre 0,001% y 0,005% incrementó notablemente

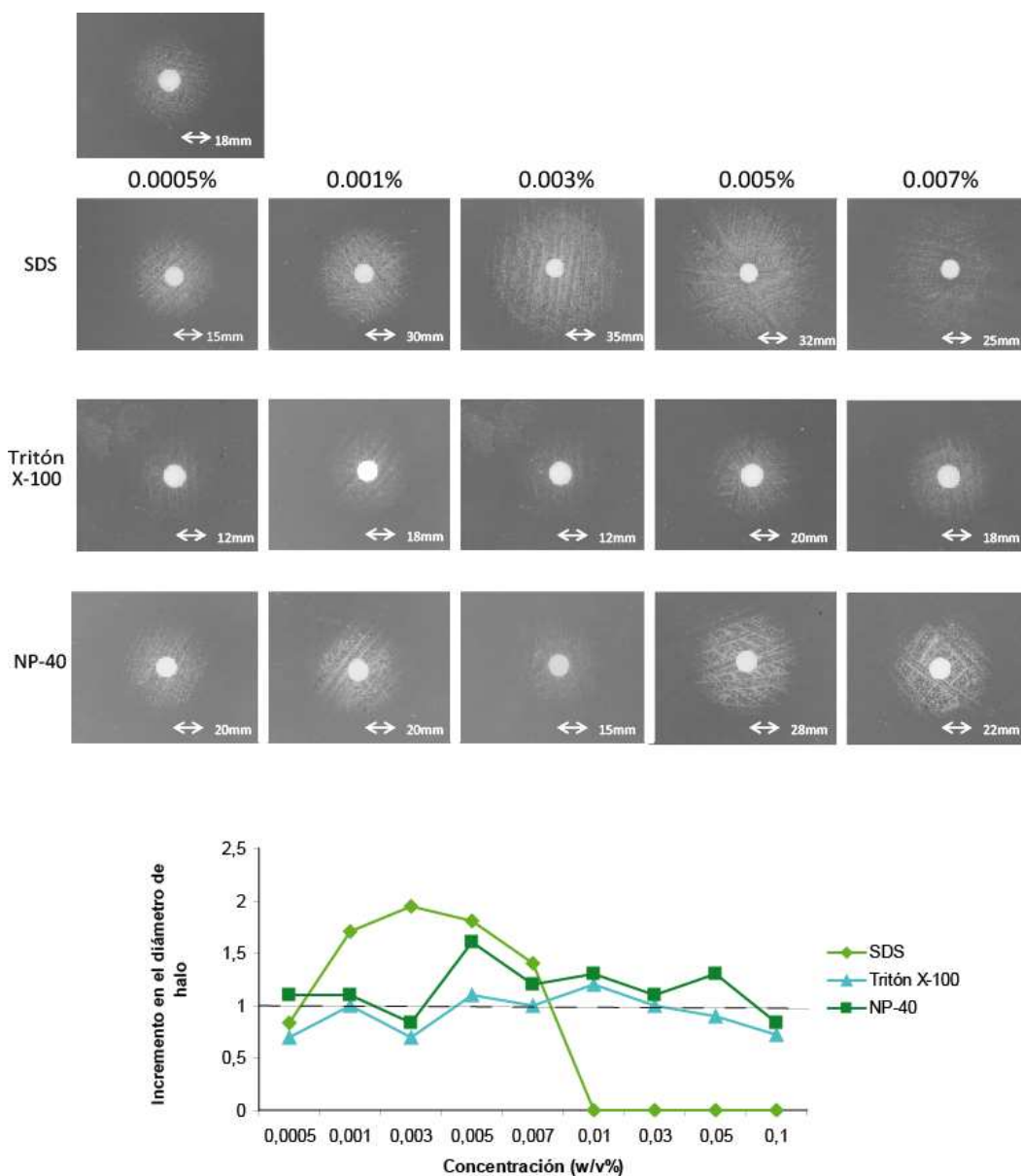


Fig.15. Ensayos de halo reverse realizados en la cepa mutante Y03951 (*snq2Δ*) expresando p110α-CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3Kα-CAAX en medio SG con distintas concentraciones (0,0005%, 0,001%, 0,003%, 0,005% y 0,007%) de los detergentes SDS, Tritón X-100 y NP-40 en presencia de un disco de celulosa cargado con el compuesto LY294002 a 10 mM; la imagen superior de la izquierda muestra un ensayo realizado sin detergente. La gráfica representa el número de veces que aumenta el diámetro de halo obtenido en los ensayos con los detergentes a las diferentes concentraciones empleadas sobre el control en ausencia de detergente, el cual se representa en la gráfica con una línea discontinua.

el diámetro del halo, siendo 0,003% la concentración de SDS con la que se produjo el máximo incremento (35 mm) de entre todos los detergentes y concentraciones evaluados. En el caso del detergente NP-40, los mayores diámetros de halo se alcanzaron a concentraciones de 0,005% (28 mm) y 0,007% (22 mm). El Tritón X-100 no

incrementó el diámetro con respecto a la cepa silvestre a ninguna de las concentraciones empleadas.

Dado que en presencia de 0,003% de SDS en el medio de cultivo se produce una notable mejora en la detección de la inhibición de PI3K en el sistema de levadura humanizada, decidimos emplear estas condiciones para la realización del bioensayo.

1.4. Validación del bioensayo optimizado con inhibidores conocidos de PI3K

Para validar el bioensayo y verificar la eficacia de las estrategias seguidas para su optimización, realizamos ensayos de inhibición tanto en medio líquido en placa multipocillo como en medio sólido en ensayo de halo reverso con levaduras tanto silvestres como mutantes carentes del transportador Snq2, así como en presencia y en ausencia de una concentración del 0,003% de SDS. En los ensayos realizados en medio líquido, los resultados se expresaron empleando el ratio de recuperación del crecimiento, calculado como el cociente del crecimiento en presencia del compuesto entre el obtenido en ausencia de mismo, lo que facilita la comparación entre las distintas condiciones del bioensayo.

En el caso del LY294002, la presencia de SDS incrementó el diámetro de halo de la cepa silvestre y del mutante *snq2Δ* en la misma medida (Figura 16A). En los ensayos realizados en medio líquido el rescate de crecimiento se incrementó como consecuencia de la presencia de SDS tanto en la cepa silvestre como en la mutante, siendo mayor en este último y a lo largo de un intervalo de concentraciones más amplio (125-4 μ M) (Figura 17A).

Con el inhibidor 15e, para el que el diámetro de halo de crecimiento en el mutante *snq2Δ* está notablemente incrementado en comparación con la cepa silvestre, la presencia de SDS incrementó el diámetro del halo en la cepa silvestre pero no en el mutante (Figura 16B). En medio líquido, la falta del transportador Snq2 y la presencia del detergente SDS incrementaron el ratio de recuperación del crecimiento considerablemente por encima del resto de las condiciones entre 15 μ M y 0,25 μ M, lográndose un rescate efectivo con concentraciones dos órdenes de magnitud inferiores

a las de la cepa silvestre; por debajo, lo hicieron la cepa silvestre en presencia de SDS y el mutante *snq2Δ* (Figura 17B).

En el caso del inhibidor PI-103, la presencia de SDS aumentó significativamente el diámetro del halo tanto en la cepa silvestre como en el mutante *snq2Δ* (Figura 16C). En medio líquido, la combinación de ambas estrategias potenció el rescate de crecimiento elevando el ratio a valores comprendidos entre 4 y 7 para concentraciones entre 10 y 0,6 μM ; la recuperación del crecimiento obtenido con este compuesto en el resto de las versiones evaluadas fue muy inferior (Figura 17C).

El ensayo de halo reverso con el compuesto con estructura de triazina ZSTK474 (Yaguchi *et al.*, 2006) produjo halos de crecimiento apenas visibles tanto en la cepa silvestre como en el mutante *snq2Δ*; sin embargo la adición de SDS permitió la aparición de un halo visible en ambos casos, siendo ligeramente superior para el mutante *snq2Δ* en presencia de SDS (Figura 16D). En medio líquido la presencia de SDS aumentó igualmente el ratio de recuperación de crecimiento para la cepa silvestre y para el mutante *snq2Δ* para concentraciones entre 20 y 0,6 μM (Figura 17D).

Por último evaluamos el comportamiento del inhibidor GDC0941, el cual presenta estructura de tieno-[3,2-d]-pirimidina y se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase II (Salphati *et al.*, 2011; Shuttleworth *et al.*, 2011). En medio sólido solo produjo la aparición de halos de crecimiento alrededor del disco en presencia de SDS, alcanzándose los mismos diámetros con la cepa silvestre y con la cepa mutante (Figura 16E). Sin embargo, en los ensayos en medio líquido el rescate del crecimiento fue muy reducido, probablemente por problemas de solubilidad en el medio de cultivo (Figura 17E).

La Figura 18 ilustra comparativamente la potencia de los distintos inhibidores en las cuatro versiones del sistema ensayadas para concentraciones equivalentes entre 4 ó 5 μM . Como se puede apreciar, el mayor rescate de crecimiento se obtuvo con el compuesto PI-103, con el cual se alcanzó un ratio de recuperación de crecimiento de 6 para el mutante *snq2Δ* con SDS, seguido del 15e con un ratio de 4 en las mismas condiciones. De la puesta a punto realizada se puede concluir que, mediante el empleo del mutante *snq2Δ* y la adición de 0,003% de SDS, se incrementa de forma notable la sensibilidad del sistema permitiendo que pueda ser empleado para la realización de bioensayos farmacológicos.

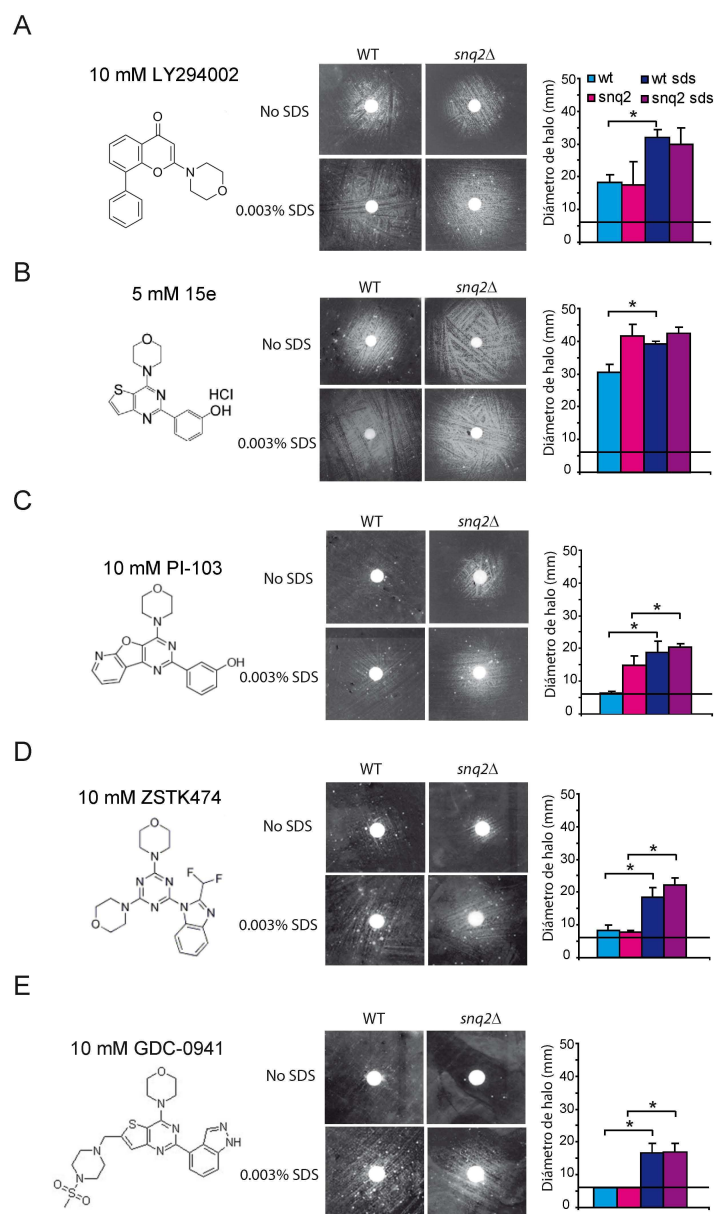


Fig.16. Estudio comparativo de cinco inhibidores de PI3K, cuya estructura química se presenta a la izquierda, en ensayo de halo reverso: (A) LY294002 a 10mM, (B) 15e a 5 mM, (C) PI-103 a 5 mM, (D) ZSTK474 a 10 mM y (E) GDC0941 a 10 mM. Los ensayos se hicieron sobre la cepa silvestre (WT) y sobre la cepa isogénica Y03951 (*snq2Δ*), en presencia y en ausencia de una concentración de 0,003% del detergente SDS en medio sólido SG. En cada gráfica se representa la media de los diámetros de los halos obtenidos en tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La línea horizontal indica el diámetro del disco de celulosa (6mm). El asterisco (*) indica significación estadística en la prueba T de Student ($p < 0.05$).

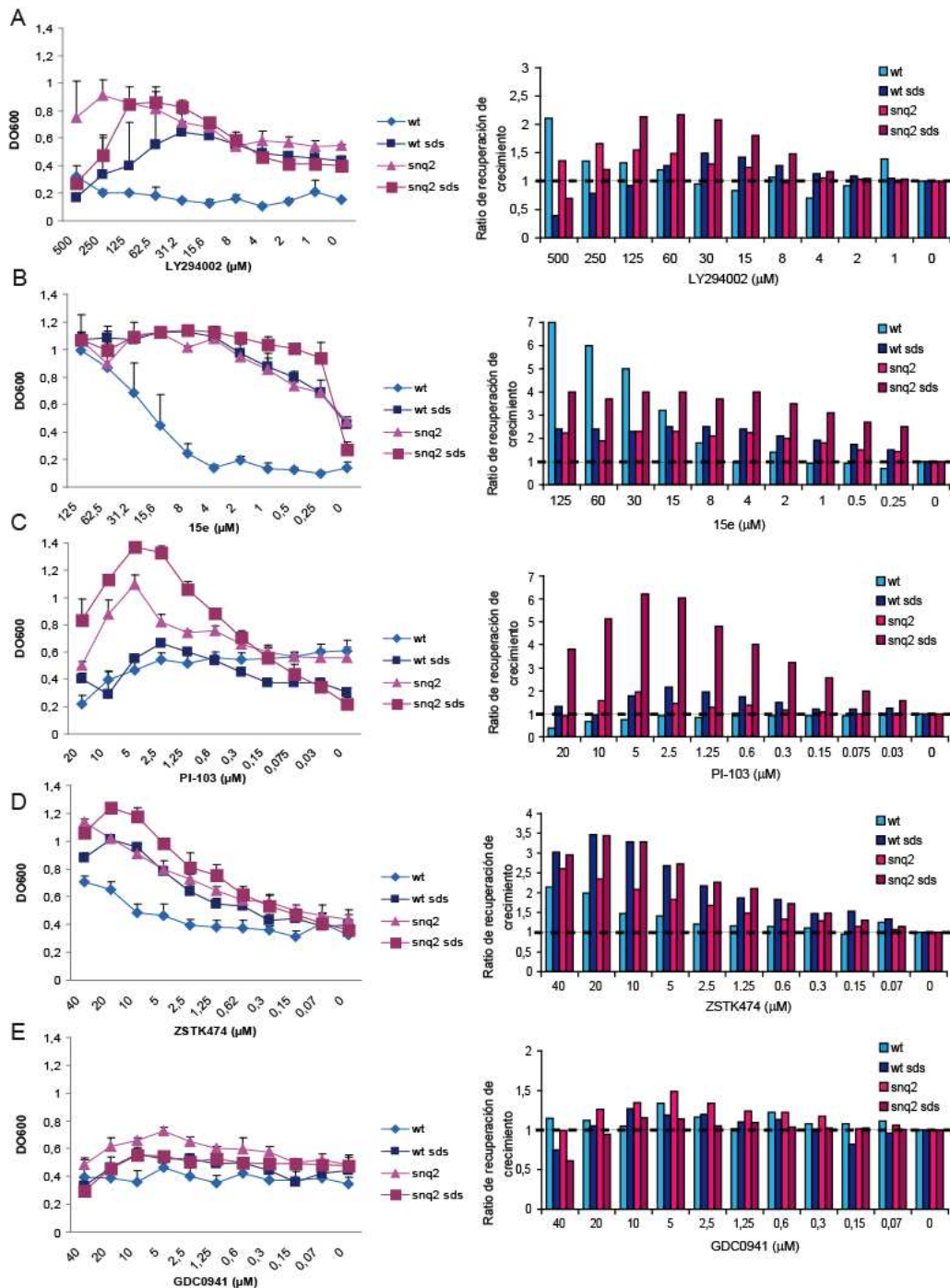


Fig.17. Estudio comparativo de cinco inhibidores de PI3K en medio líquido SG: (A) LY294002, (B) 15e, (C) PI-103, (D) ZSTK474 y (E) GDC0941. Los ensayos se realizaron en la cepa silvestre (WT) y sobre la cepa isogénica Y03951 (*snq2Δ*), tanto en presencia como en ausencia de una concentración de 0,003% del detergente SDS. El crecimiento se midió 30 horas después de la incubación en presencia de los inhibidores y se representó en la gráfica como DO_{600} frente a las concentraciones decrecientes de los compuestos que se emplearon para el ensayo. Las gráficas corresponden a la media de tres experimentos, cuya desviación estándar se representa como barras de error. A la derecha se expresan los resultados como ratio de recuperación de crecimiento para cada una de las versiones evaluadas frente a concentraciones decrecientes de compuesto.

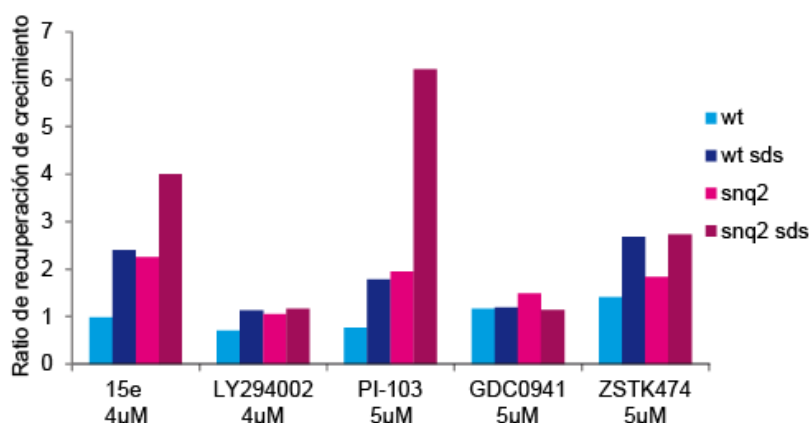


Fig.18. Estimación de la eficacia de cinco inhibidores de PI3K en las diferentes versiones del bioensayo en levadura. Los ratios obtenidos en los ensayos realizados en medio líquido con los inhibidores a concentraciones entre 4-5 μ M (Figura 17) se representan en la gráfica para facilitar su comparación.

1.5. La realización de ensayos de inhibición en el mutante *vip1Δ* permite el análisis de inhibidores de Akt en levaduras

La co-expresión de la versión silvestre de la subunidad catalítica p110 α con su efector Akt causa un efecto tóxico en la levadura dependiente tanto de la activación de Akt por PI3K como de la propia actividad catalítica de Akt, ya que ni Akt1 ni p110 α por sí solas, ni la combinación de p110 α con una versión inactiva de Akt (Akt1^{K179M}) inhiben el crecimiento (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009). Dado que la expresión de este componente adicional de la ruta también ocasiona una interferencia en el crecimiento de la levadura en estas condiciones, nos planteamos llevar a cabo la puesta a punto del sistema integrando ambas proteínas con el fin de extender su utilidad al estudio de inhibidores de Akt. En el apartado 1.1 se vio como el inhibidor 15e pudo rescatar ligeramente el crecimiento de una levadura co-expresando p110 α con Akt en medio líquido, mediante una inhibición directa de p110 α . Sin embargo, dado que el efecto de p110 α con Akt no es muy agresivo para la levadura, resulta difícil apreciar un rescate en el crecimiento en el ensayo de halo reverso en medio sólido, tanto con este inhibidor de p110 α como con un inhibidor competitivo de Akt (Figura 19). Por este motivo decidimos emplear un mutante en el que la inhibición del crecimiento causada por la co-expresión de estas dos proteínas se agravase.

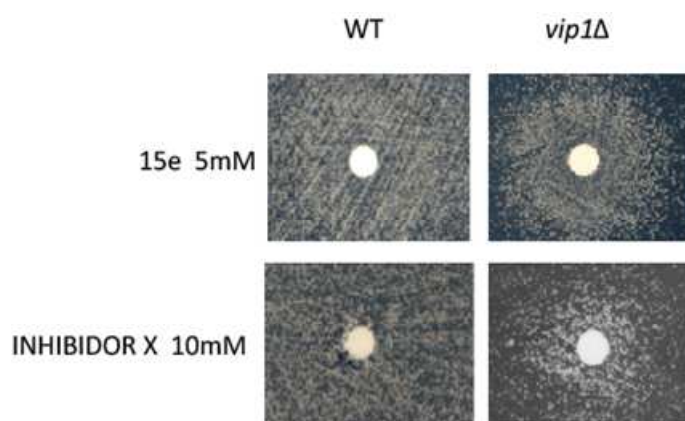


Fig.19. Ensayo de halo reverso en levaduras de la cepa silvestre (WT) YPH499 o en la cepa isogénica IR561 (*vip1Δ*) co-expresando la subunidad catalítica silvestre de PI3K y Akt1 en medio SG en presencia del inhibidor de PI3K 15e y con el inhibidor X de Akt a concentraciones de 5 y 10 mM respectivamente.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Rodríguez-Escudero *et al.*, comunicación personal) determinaron que en un mutante *vip1Δ*, el cual carece de una quinasa no esencial implicada en la síntesis de inositol fosfatos en levadura, la inhibición del crecimiento causada por Akt era mayor que en un fondo silvestre. Los ensayos de halo reverso realizados en este mutante tanto con el inhibidor 15e como con el Inhibidor X de Akt permitieron la detección de un halo de crecimiento claramente visible alrededor del disco (Figura 19). Posteriormente llevamos a cabo ensayos utilizando el mutante *vip1Δ*, en medio líquido y en medio sólido, con el inhibidor X y otros inhibidores de Akt: inhibidor XI y tricitribina (Schweinsberg PD, *et al.*, 1981), que actualmente se encuentra en fase I de ensayos clínicos.

El rescate de crecimiento obtenido en medio líquido por estos inhibidores fue en general reducido, alcanzándose solo ratios de recuperación de crecimiento por debajo de 2 (Figura 20). En el caso del inhibidor X las concentraciones efectivas para la recuperación estaban comprendidas entre 31 y 6 μM ; para la tricitribina fueron incluso superiores, precisándose concentraciones entre 500 y 62,5 μM ; en cambio, con el inhibidor XI la mayor recuperación se obtuvo a concentraciones un orden de magnitud por debajo de las de los otros dos inhibidores de Akt, comprendidas entre 0,5 y 0,06 μM . En los ensayos en medio sólido solo se observó halo de crecimiento en el caso del inhibidor X, mientras que con el inhibidor XI y con la tricitribina tan solo se apreciaron algunas colonias aisladas alrededor del disco.

Por tanto, en este sistema los inhibidores disponibles comercialmente de Akt no parecen ejercer una recuperación del crecimiento de la levadura tan efectivo como el que ejercen los inhibidores de PI3K, pese a que el efecto de recuperación del crecimiento puede llegar a manifestarse a concentraciones muy reducidas, como en el caso del inhibidor XI.

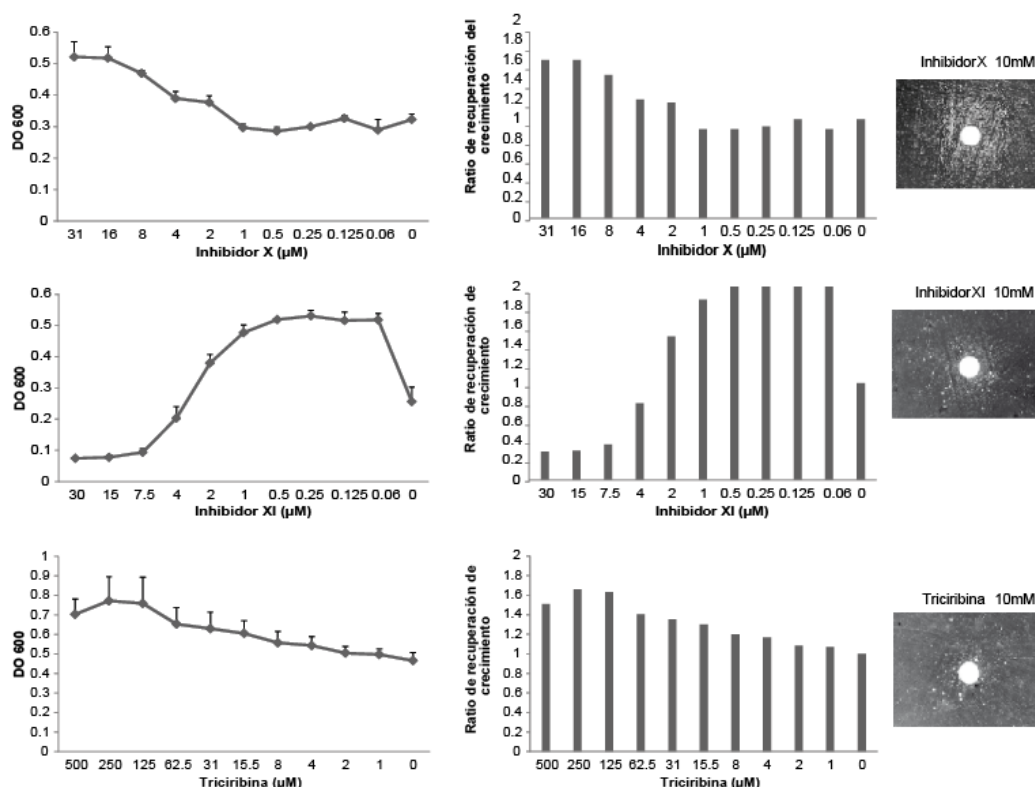


Fig.20. Ensayos sobre levaduras de la cepa IR561 (*vip1Δ*) co-expresando la subunidad catalítica silvestre p110α con Akt1 en medio SG, de tres inhibidores de Akt: inhibidor X, inhibidor XI y triciribina. A la izquierda las gráficas obtenidas en los ensayos realizados en medio líquido representan DO₆₀₀ frente a concentraciones decrecientes de compuesto; las gráficas del centro representan el ratio de recuperación de crecimiento para cada una de las concentraciones evaluadas sobre el control en ausencia de inhibidor frente a concentraciones decrecientes de compuesto; a la derecha se muestran los halos de crecimiento en medio sólido SG obtenidos con los tres inhibidores a la concentración de 10 mM.

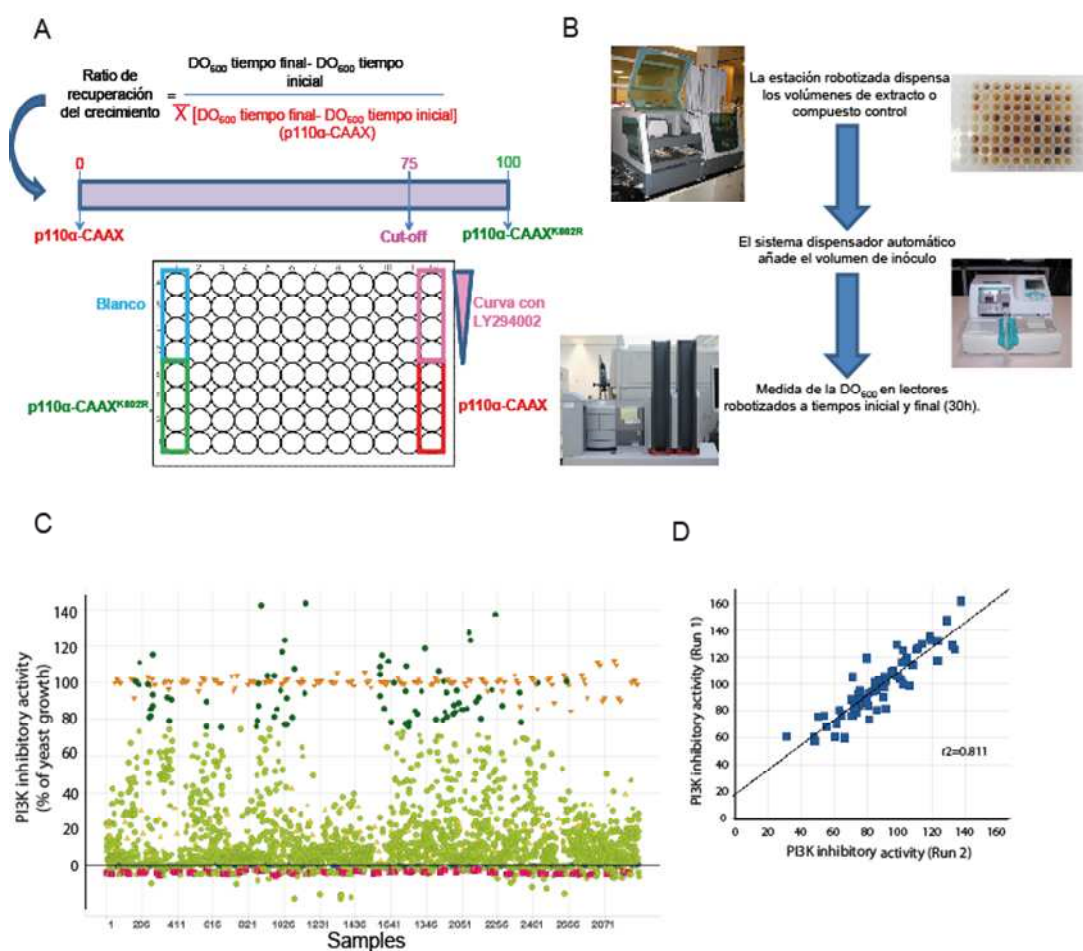
1.6. Utilización del bioensayo de PI3K en levadura en un rastreo piloto de búsqueda de inhibidores en extractos de origen microbiano

De la fase de puesta a punto del bioensayo en levadura para detectar inhibidores de PI3K concluimos que las condiciones óptimas para la detección consistían en la expresión de la versión p110α-CAAX en mutante *snq2Δ* y con una concentración de SDS

Resultados

del 0,003% en el medio de cultivo. Decidimos llevar a cabo un ensayo piloto de rastreo a gran escala HTS (*High throughput screening*) sobre este sistema con una colección de extractos de origen natural obtenidos a partir de cultivos de actinomicetos y hongos (Genilloud *et al.*, 2011), propiedad de la Fundación MEDINA.

Inicialmente validamos las condiciones del rastreo a gran escala con un grupo de 2560 extractos correspondientes a 34 placas de la colección; escogimos al azar los extractos entre los 100.000 que tiene la colección entera para que estuviera adecuadamente representada. En cada una de las placas distribuimos los controles correspondientes (Figura 21A). Primeramente un sistema robotizado añadía los diferentes extractos o el compuesto control y a continuación, un dispensador automatizado añadía el inóculo de levaduras diluidas en el medio de cultivo; por último medíamos la DO₆₀₀ previa y posteriormente a la incubación (Figura 21B). Para expresar los resultados se calculó el ratio de recuperación de crecimiento según la fórmula que se indica (Figura 21A). Posteriormente se normalizó considerando el 100% de crecimiento el ratio



de levaduras expresando p110 α -CAAX^{K802R} y 0% el de aquellas expresando p110 α -CAAX. Se determinó que solo aquellos extractos que hacían crecer a levaduras expresando p110 α -CAAX al menos un 75% de lo que crecían aquellas expresando p110 α -CAAX^{K802R}, eran considerados positivos (Figura 21A). En esta primera fase 80 extractos pasaron este punto de corte considerado para la selección de positivos (Figura 21C). Con todos estos extractos realizamos el ensayo posteriormente por triplicado para evaluar la reproducibilidad de éste; 64 de los 80 inhibieron de nuevo la actividad de PI3K con el criterio exigido. El coeficiente de determinación (r^2) entre dos de las réplicas del ensayo de confirmación realizado con este conjunto fue del 0,811 indicando una buena correlación entre los datos obtenidos (Figura 21D).

Una vez que el ensayo había demostrado ser viable y tener suficiente reproducibilidad como para ser realizado a gran escala, se calcularon los parámetros Z' y RZ' (Zhang *et al.*, 1999; Kummel *et al.*, 2010) para este grupo inicial de 2560 extractos, con objeto de evaluar si el ensayo tenía también una adecuada calidad y robustez. El coeficiente Z' es

Fig.21. Ensayo piloto de rastreo a gran escala (HTS) empleando el bioensayo en levadura para la búsqueda de extractos con actividad frente a p110 α -CAAX, en la cepa mutante Y03951 (*snq2 Δ*) en presencia de SDS 0,003% . (A) Distribución de los controles en las placas del rastreo y procedimiento de cálculo y normalización de los resultados. Los pocillos sin inóculo (Blanco) están señalados en azul, el control de crecimiento (p110 α -CAAX^{K802R}) correspondiente a levaduras expresando el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX, en verde; el control de actividad de p110 α -CAAX correspondiente a levaduras expresando el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX, en rojo; y el control interno (Curva con LY294002) correspondiente a levaduras expresando p110 α -CAAX en presencia de LY294002 a concentraciones de 125, 62,5, 31,25 y 16 mM, en rosa. El ratio de recuperación de crecimiento se calculó dividiendo los valores de DO₆₀₀ finales menos las iniciales para cada uno de los pocillos de la placa entre la media de los valores de DO₆₀₀ finales menos las iniciales para los pocillos empleados como control de actividad de p110 α -CAAX. Posteriormente, se aplicó una normalización que asignó a la media de los ratios de los controles de actividad de p110 α -CAAX el 0% de recuperación de crecimiento y a la de los controles de crecimiento expresando p110 α -CAAX^{K802R} el 100%. Se consideraron como positivos aquellos extractos que hicieron crecer a la levadura igual o más que el 75% dentro de esta escala. (B) Diagrama de flujo que indica las distintas etapas seguidas en la realización del ensayo. (C) El diagrama muestra la dispersión de los 2560 extractos ensayados durante la etapa inicial de validación. En ordenadas se representa la actividad de los distintos extractos. En naranja se indica el crecimiento normalizado de levaduras expresando p110 α -CAAX^{K802R}; los extractos con una actividad inferior al 75% se representan en verde claro y aquellos con una actividad igual o superior al 75% se representan en verde oscuro y son los considerados positivos. En amarillo se representa, el crecimiento normalizado de levaduras expresando p110 α -CAAX en ausencia de tratamiento. En rojo se representa el blanco sin inocular. (D) Verificación de la reproducibilidad del ensayo con los extractos que presentaron actividad en el rastreo primario. El ensayo se realizó por triplicado con los 80 extractos que resultaron positivos. La gráfica muestra la actividad frente a PI3K en dos réplicas distintas para este conjunto de extractos. El coeficiente de determinación (r^2) fue 0,811.

un parámetro que indica la calidad del ensayo para identificar un compuesto positivo basándose en el rango dinámico del *screening*, es decir, en la ventana que existe entre los valores alcanzados por el control positivo y negativo y su dispersión, y está referido a una sola lectura; cuanto más próximo a 1 mejor es la calidad del ensayo. El RZ' es una variación de éste que permite su aplicación para múltiples lecturas y parámetros. Los coeficientes Z' y RZ' fueron respectivamente de $0,89 \pm 0,10$ y $0,92 \pm 0,10$, indicando que efectivamente el bioensayo mostraba condiciones adecuadas para ser realizado a mayor escala.

Por ello realizamos un segundo rastreo hasta abarcar un número total de 9600 extractos de la misma colección. De ellos, 267 (2,8%) permitieron un crecimiento de la levadura por encima del umbral establecido del 75% del control de referencia (Figura 22A). De forma rutinaria, todos los que mostraron una actividad inhibitoria sobre p110 α -CAAX en el rastreo primario se evaluaron, al igual que en la etapa de validación, por triplicado, mostrando un resultado positivo reproducible el 43,4% de ellos (115 extractos). Con objeto de descartar si este comportamiento se debía a una actividad inespecífica del extracto que pudiera actuar bloqueando algún proceso celular básico relacionado con la síntesis de proteínas o con la expresión dependiente del promotor *GAL1*, ensayamos la actividad de estos extractos frente a una levadura expresando la proteína de *Salmonella* SopB. Ésta es una proteína con actividad lípido fosfatasa que cuando se expresa en levadura bajo el control del promotor *GAL1* desde el mismo plásmido utilizado para el ensayo de p110 α -CAAX también resulta tóxica (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2006). En este caso, los extractos se incubaron en presencia de levaduras expresando SopB y los controles empleados en cada placa fueron los mismos, a excepción del control negativo de crecimiento, constituido por levaduras expresando SopB. Se consideró que los extractos actuaban de forma específica sobre la actividad p110 α -CAAX cuando no eran capaces de recuperar el crecimiento de las levaduras expresando SopB por encima del 50% respecto al que presentaban levaduras control expresando p110 α -CAAX^{K802R}. Según este criterio, el 51% (60) de los extractos positivos y que habían mostrado reproducibilidad resultaron específicos para p110 α -CAAX. Por último, utilizamos el mismo bioensayo basado en la expresión de p110 α -CAAX para evaluar el comportamiento dosis-respuesta de estos extractos en diluciones seriadas (Figura 22B). El 91,6% de los extractos que habían resultado específicos presentaron también una

buena correlación dosis-respuesta en este ensayo (El 70,9% de las curvas dosis-respuesta presentaron un $R^2 > 0,91$ siendo la media $R^2 = 0,81 \pm 0,25$).

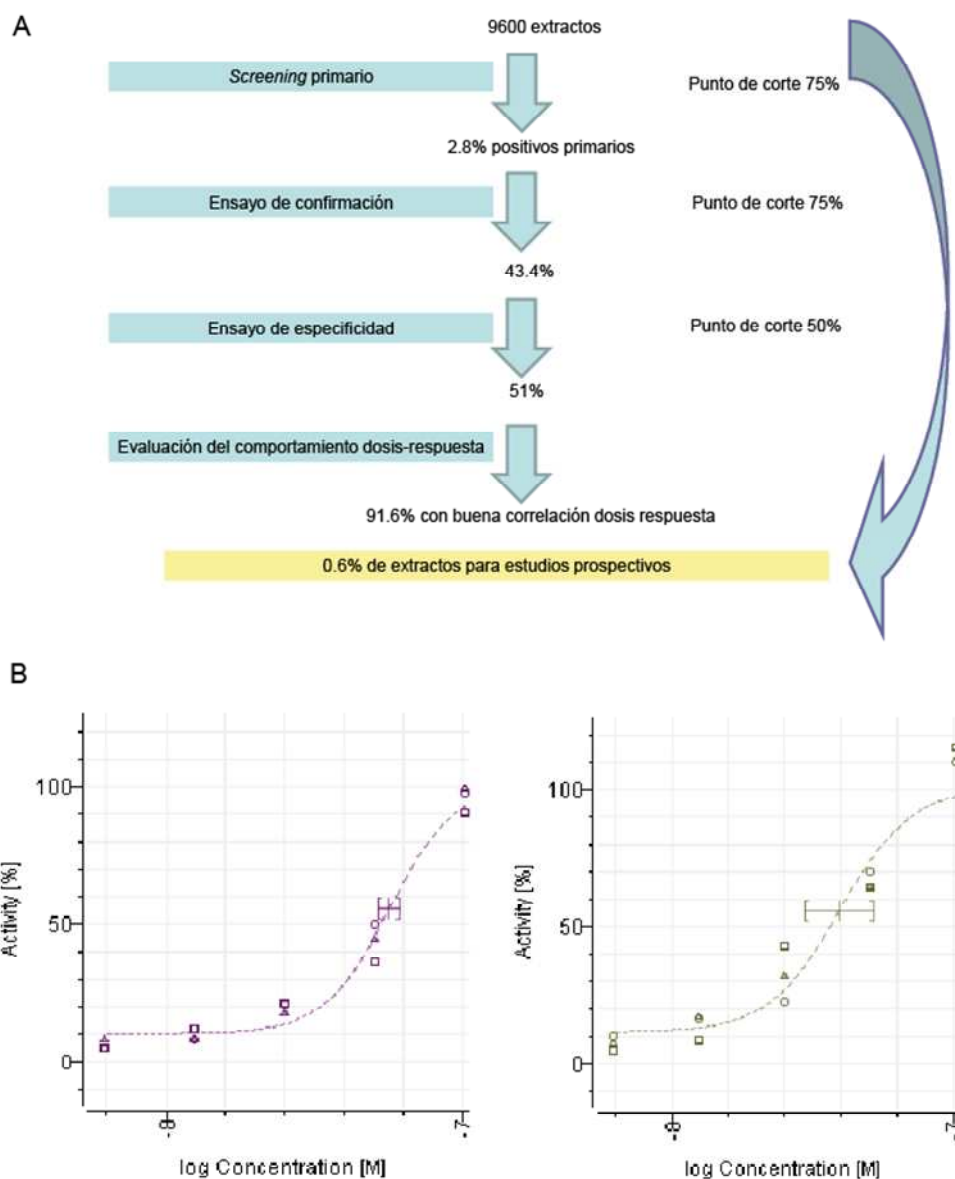


Fig. 22. Ensayo piloto de rastreo a gran escala (HTS). (A) El diagrama muestra las sucesivas etapas seguidas en el rastreo y los porcentajes de extractos que resultaron positivos en cada una de ellas. (B) Las gráficas muestran dos ejemplos de adecuada correlación dosis-respuesta de dos de los extractos que resultaron positivos en el ensayo frente a p110 α -CAAX; las curvas corresponden a los datos de actividad, representados en ordenadas, frente a la concentración del extracto en valores logarítmicos, representados en abscisas, obtenidos por triplicado. La línea horizontal indica el intervalo de confianza del 95% dentro del cual se encuentra la media de la concentración inhibitoria 50 (IC50), calculada por la aplicación *Condoseo* del programa *Genedata Screener*.

En resumen, 55 extractos, que conforman el 0,6% de los 9600 extractos evaluados, resultaron positivos en el rastreo piloto y fueron seleccionados para estudios prospectivos por presentar una presunta actividad inhibitoria directa frente a PI3K en el sistema de levadura humanizada (Figura 21C). En la actualidad la actividad de estos extractos está siendo valorada en la Fundación MEDINA, mediante la realización de ensayos *in vitro* de inhibición p110 α y ensayos *in vivo* frente a líneas celulares transformadas.

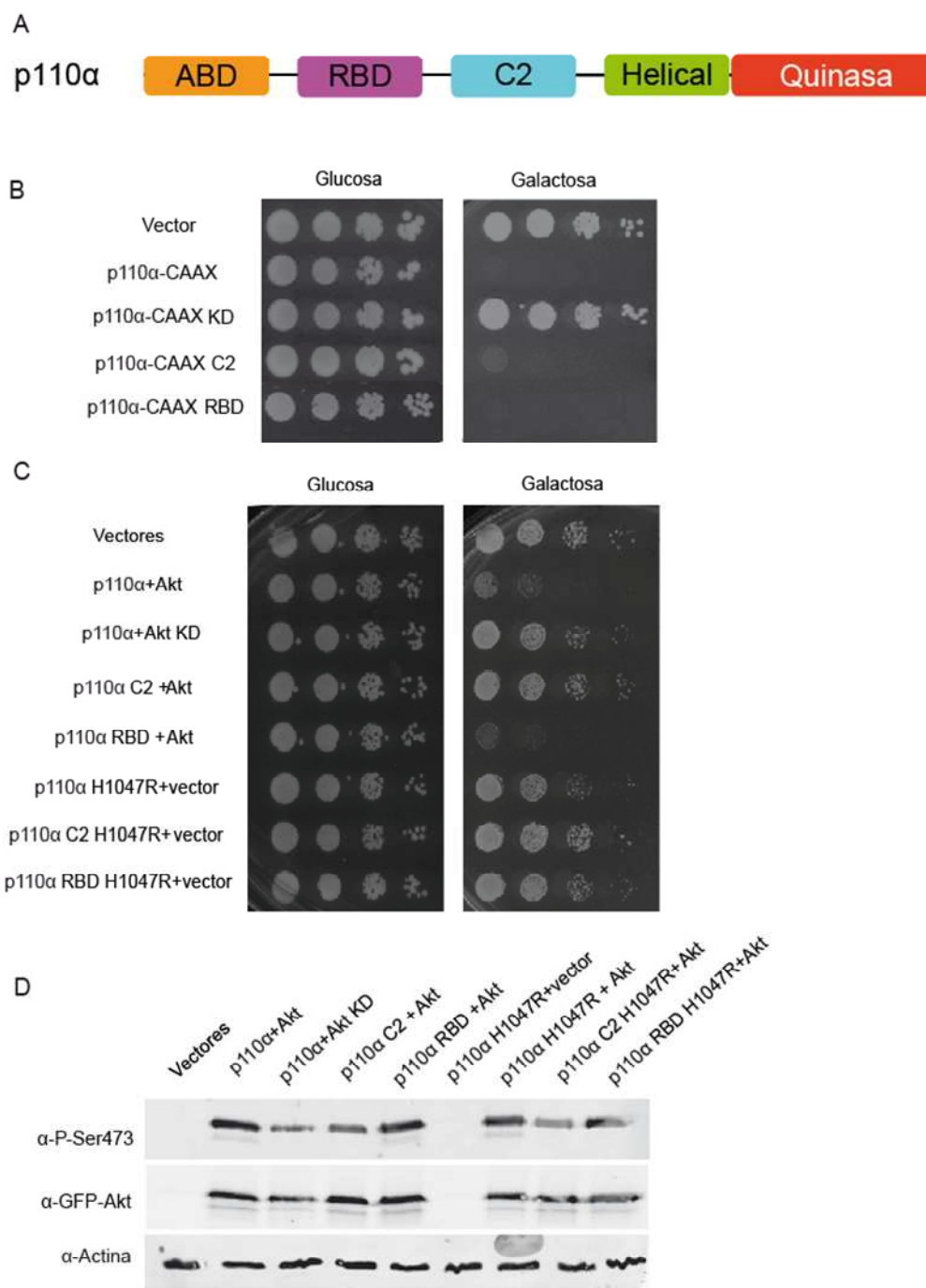
2. Estudios de relación estructura-actividad de la subunidad catalítica p110 α en el modelo de levadura.

2.1. Análisis funcional del dominio de unión a Ras (RBD) y del dominio C2 de la subunidad catalítica p110 α en levadura

Como se describió previamente, la subunidad catalítica p110 α consta de un dominio de unión a la subunidad reguladora (ABD), un dominio de unión al producto del oncogén H-Ras (RBD; *Ras-Binding Domain*), un dominio C2 de unión a los lípidos de la membrana, un dominio helicoidal y un dominio quinasa (Vadas *et al.*, 2011) (Figura 23A). Resultados previos ya demostraron que la inhibición del crecimiento ejercida por una forma constitutivamente activa de esta proteína (p110 α -CAAX) en levadura se debe a su actividad quinasa dado que un mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} no ejercía dicho efecto (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005) (Figura 23B). Con objeto de determinar la función de otros dominios de esta proteína en el modelo de la levadura decidimos introducir una serie de sustituciones puntuales en los dominios C2 y RBD y evaluar la influencia de dichas mutaciones en la toxicidad de la proteína *in vivo*.

Los dominios C2 son motivos presentes en determinadas proteínas que están implicados en la interacción con fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática. Se ha relacionado a una serie de aminoácidos básicos del dominio C2 de p110 α con la interacción con los lípidos de la membrana plasmática mediante fuerzas electrostáticas (Huang *et al.*, 2008). Para determinar si estos residuos tenían un papel importante para la actividad de p110 α -CAAX en levadura los mutamos a alanina (K410A, R412A, K413A, K416A) mediante mutagénesis dirigida con objeto de disminuir la carga positiva que estos aminoácidos básicos le confieren a este dominio. Cuando expresamos esta versión mutante solo observamos una disminución muy leve del efecto tóxico causado por la

expresión de la versión de la proteína silvestre (Figura 23B). Esto implica que este grupo de residuos básicos es dispensable para la actividad catalítica.



Las proteínas de la familia Ras interaccionan con la subunidad catalítica de la PI3K a través de su dominio de unión a Ras (RBD), regulando positivamente su actividad mediante su reclutamiento a la membrana plasmática. Se ha descrito que el cambio del residuo de lisina (K) en posición 227 por un residuo de glutámico (E) en el RBD de la

Fig.23. Efecto de mutaciones en el dominio C2 y RBD sobre el efecto de PI3K en levadura. (A) Estructura de la subunidad catalítica de PI3K p110 α donde se indican los distintos dominios de la proteína. (B) Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa YPH499 de *S. cerevisiae* expresando un plásmido vacío (YCpLG), el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (p110 α -CAAX), el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (p110 α -CAAX KD), el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX C2 conteniendo las mutaciones en el dominio C2 (p110 α -CAAX C2) o el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX RBD en el dominio RBD (p110 α -CAAX RBD). (C) Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa YPH499 co-expresando dos vectores vacíos (YCpLG y pYES2), los plásmidos YCpLG-PI3K α y pYES2-GFP-Akt1 o el mutante catalíticamente inactivo de Akt (Akt KD) desde el plásmido pYES-GFP-AktK179M, los plásmidos YCpLG-PI3K α C2 o YCpLG-PI3K α RBD con pYES2-GFP-Akt1, y los plásmidos YCpLG-PI3K α (H1047R), YCpLG-PI3K α (H1047R) C2 o YCpLG-PI3K α (H1047R) RBD con un vector vacío (pYES2). (C) *Western-blotting* de extractos de células co-expresando los mismos plásmidos que en (B) con anticuerpos específicos frente a la forma fosforilada de Akt P-Ser473 (α -P-Ser473), frente a GFP para valorar la cantidad total de GFP-Akt y frente a la actina como control de carga.

subunidad p110 α suprime la interacción con esta proteína (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996). Puesto que la levadura posee GTPasas homólogas a las proteínas Ras de mamíferos, Ras1 y Ras2, decidimos verificar si una posible interacción con estas GTPasas afectaba a la función de p110 α en levadura. La introducción de la mutación K227E en p110 α -CAAX no alteró el fenotipo de inhibición del crecimiento respecto a la versión silvestre (Figura 23B).

Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta que en presencia de un motivo de prenilación p110 α es direccionada constitutivamente a la membrana plasmática y esto evita que se aprecien los efectos de mutaciones que pueden influir en mayor o menor medida sobre la capacidad de esta proteína para interaccionar con la membrana plasmática. Como se ha expuesto anteriormente, aunque p110 α es inocua en ausencia de la señal de prenilación, la co-expresión de esta proteína junto con Akt causa una inhibición de crecimiento dependiente de esta última quinasa, si bien no tan drástica como la que ejerce p110 α -CAAX. Por lo tanto, la introducción de estas mutaciones sobre la versión silvestre en co-expresión con Akt permitiría una mejor apreciación del efecto de las mutaciones introducidas en p110 α . Al co-expresar la correspondiente versión mutante en el dominio C2 (p110 α C2) junto con Akt se observó una notable disminución de la inhibición de crecimiento, de forma que se lograron alcanzar los niveles de crecimiento de una estirpe co-expresando p110 α silvestre con el mutante catalíticamente inactivo de Akt, Akt^{K179M} (Figura 23C). Cuando introducimos la mutación sobre el RBD, no se apreció ningún cambio en el efecto sobre el crecimiento. Por último, generamos las mismas mutaciones sobre el mutante oncogénico p110 α ^{H1047R}, el cual

cuando se expresa en ausencia de Akt en levadura ocasiona una inhibición moderada del crecimiento. Igualmente, la versión que portaba las mutaciones en el dominio C2, p110 α C2^{H1047R}, provocó menor inhibición de crecimiento que la causada por el mutante p110 α ^{H1047R}, mientras que la que portaba la mutación sobre el dominio RBD, p110 α RBD^{H1047R} se comportó de la misma manera que este mutante (Figura 23C).

En nuestro modelo el grado de inhibición de crecimiento se correlaciona con el nivel de activación de PI3K, que se refleja en el nivel de fosforilación de su efector, Akt. Para analizar los efectos de las versiones mutantes generadas sobre la activación de Akt, estudiamos la fosforilación de Akt1 en uno de los dos residuos fosforilables necesarios para su activación (Ser473). En concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento, la expresión del mutante en el dominio C2, p110 α C2, y sobre todo la del mutante p110 α C2^{H1047R}, ocasionó un menor nivel de fosforilación de Akt, en comparación con las correspondientes versiones sin esa mutación, p110 α y p110 α ^{H1047R}, respectivamente (Figura 23D). Por el contrario, los niveles de fosforilación de Akt en las células que expresaban los mutantes p110 α RBD y p110 α RBD^{H1047R} fueron similares a los mostrados por las equivalentes proteínas no mutantes (Figura 23D). Estos resultados indican que la inhibición de crecimiento que ejercen p110 α y p110 α ^{H1047R} a través de la activación de Akt se debe en parte a la presencia de los cuatro residuos básicos presentes en el dominio C2, lo que sugiere que contribuyen a su interacción con los lípidos de la membrana plasmática. Por el contrario, la interacción con las proteínas Ras a través del dominio RBD de p110 α no parece afectar a su función *in vivo*.

2.2. La introducción de una señal N-terminal de miristoilación en p110 α ocasiona la inhibición del crecimiento de la levadura

Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Vogt (San Diego, CA) habían demostrado que la introducción de una secuencia aminoacídica corta en la parte N-terminal de la subunidad catalítica p110 α induce una ganancia de función *in vivo* al ser expresada en células de mamífero (Sun *et al.*, 2011). La introducción de estas señales en p110 α podría estar aumentando la afinidad de la interacción de esta proteína con la membrana plasmática o bien estar afectando a su interacción con los elementos que regulan la actividad de p110 α , como Ras o la subunidad reguladora p85.

En nuestro modelo, la interacción con la membrana plasmática es importante para la actividad de p110 α en levadura y de ello depende el nivel de inhibición de crecimiento; así lo sugieren los resultados descritos en el apartado 2.1 acerca de los efectos causados por las mutaciones introducidas en el dominio C2 de p110 α . Para determinar si la introducción de secuencias aminoacídicas en N-terminal estaba afectando a la interacción de p110 α con la membrana plasmática decidimos expresar estas mismas versiones en levadura, en colaboración con dicho grupo de investigación.

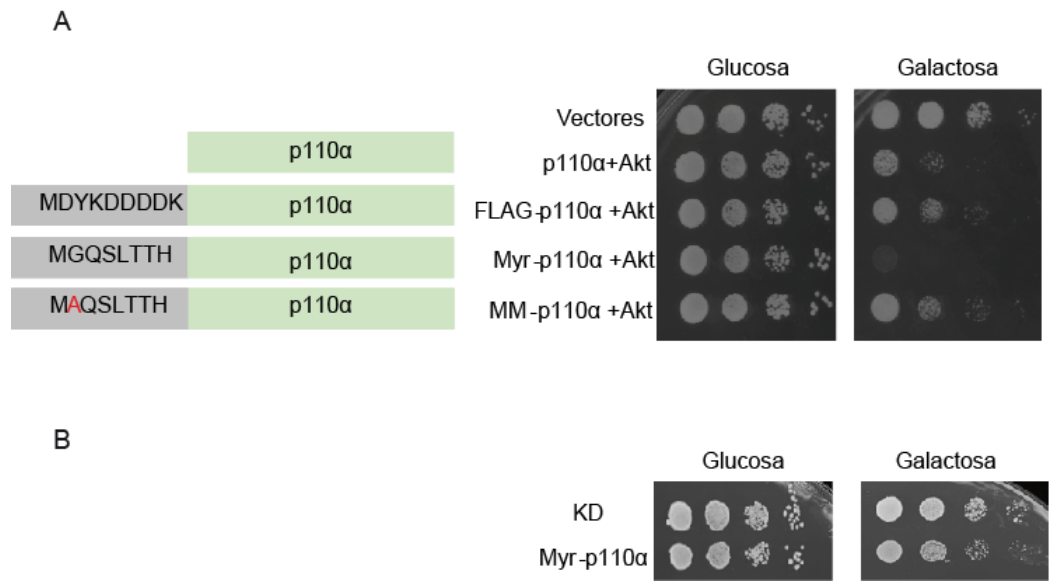


Fig.24. Efecto de la introducción de secuencias aminoacídicas en el extremo N-terminal de p110 α sobre la inhibición de crecimiento ejercida por esta proteína en levadura. (A) Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa YPH499 de *S. cerevisiae* co-expresando dos plásmidos vacíos (YCpLG y pYES2), o los plásmidos YCpLG-PI3K α , YCpLG-FLAG-PI3K α , YCpLG-Myr-PI3K α Q o YCpLG-MutMyr-PI3K α Q con pYES2-GFP-Akt1. El diagrama de la izquierda muestra la secuencia aminoacídica de los epítomos FLAG, la señal de miristoilación y la señal de miristoilación con una mutación (en rojo). (B) Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* expresando el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-Myr-PI3K α Q.

Introdujimos tres señales diferentes en p110 α : el epítipo FLAG, una señal de miristoilación que la dirige constitutivamente a la membrana plasmática y la misma señal portando una mutación que impide la reacción de miristoilación. Cuando se co-expresaron estas versiones en levadura junto con Akt se apreció que la versión que llevaba la señal de miristoilación producía un incremento en la inhibición del crecimiento con respecto al control sin la señal (Figura 24A). Este efecto también ocurrió cuando se expresaba esta versión en ausencia de Akt (Figura 24B), probablemente

porque la N-miristoilación, al igual que la C-prenilación, direcciona a la enzima a las membranas, donde se halla su sustrato, el PtdIns-4,5-P₂. En resumen, la inserción de una señal de miristoilación N-terminal en la subunidad p110 α causa una inhibición de crecimiento apreciable. Sin embargo, en el modelo de levadura no se observa el efecto de potenciación de la actividad por el epítipo FLAG descrito por el Dr. Vogt, sino que la inhibición de crecimiento ejercida por esta versión parece disminuir en comparación con la versión silvestre. Estos datos sugieren que el efecto que se observa al introducir una secuencia aminoacídica en N-terminal afecta bien a la interacción con Ras, prescindible en nuestro modelo, como hemos demostrado, o bien con la subunidad regulatoria p85, ausente en la levadura.

3. Caracterización de los efectos de la conversión de PtdIns-4,5P₂ en en PtdIns-3,4,5P₃ en *S. cerevisiae*

3.1. La expresión de PI3K reduce la viabilidad de *S. cerevisiae*.

Como ya se ha mencionado, la expresión en levadura de la subunidad catalítica fusionada a una señal de prenilación (p110 α -CAAX) causa una inhibición del crecimiento dependiente de la actividad catalítica de esta proteína. Este fenotipo puede producirse bien como consecuencia de que la expresión de esta proteína ocasione la pérdida de viabilidad celular o bien porque provoque que las células entren en un estado de quiescencia. Uno de los métodos más comúnmente empleados para detectar la pérdida de viabilidad es el ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), que se basa en la capacidad de las células vivas de una población para dividirse y generar colonias en medio sólido.

Los cultivos de levaduras expresando p110 α -CAAX durante 8 horas presentaron una viabilidad celular alrededor de 46% y de un 53% en dos fondos genéticos diferentes, BY4741 e YPH499 respectivamente (Figura 25), con respecto a las células expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} como control, para el que se asignó una viabilidad del 100%. Estos resultados indican que existe una pérdida de viabilidad cuando se expresa p110 α -CAAX, de acuerdo con la idea de que su sustrato, el PtdIns-4,5P₂ es un fosfoinosítido esencial para la célula de levadura.

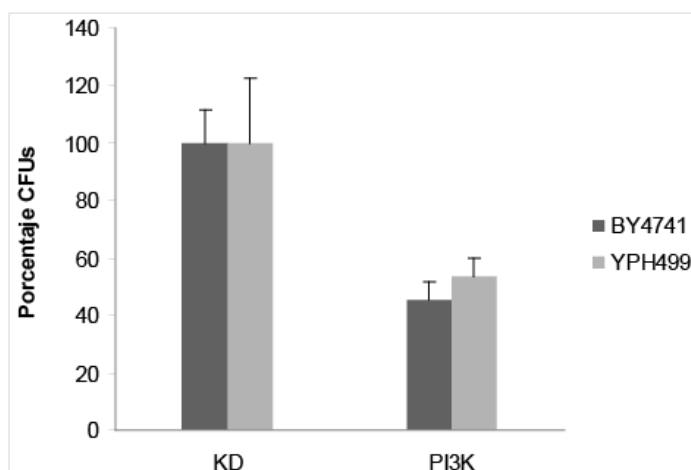


Fig. 25. Viabilidad celular de células expresando p110 α -CAAX. Recuento del porcentaje de unidades formadoras de colonias (CFUs) obtenido tras 48 horas de incubación en medio SD células de las cepas silvestres BY4741 e YPH499 que habían expresado durante 8 horas en medio líquido SG el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o p110 α -CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K).

3.2. La pérdida de polaridad del citoesqueleto de actina inducida por la expresión de PI3K se correlaciona con la disminución de los niveles de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática

Resultados previos de nuestro grupo (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005) habían puesto de manifiesto que en condiciones de expresión de PI3K (p110 α -CAAX) se producía una pérdida del PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática; éste se puede visualizar mediante la expresión de un marcador de este fosfoinosítido que está constituido por una fusión a GFP del dominio PH de la fosfolipasa C δ [GFP-2xPH(PLC δ)] (Yu *et al.*, 2004). Esta sonda presenta una elevada especificidad por este fosfoinosítido y se localiza en la membrana plasmática de la célula en condiciones normales. La expresión de p110 α -CAAX produce una pérdida de la polaridad del citoesqueleto de actina, el cual normalmente se encuentra polarizado hacia la nueva yema emergente en crecimiento (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la integridad y adecuada polimerización del citoesqueleto de actina está regulada positivamente por este fosfoinosítido (Saarikangas *et al.*, 2010), decidimos estudiar si la dinámica de desaparición de PtdIns-4,5P₂ debida a la actividad de PI3K se correlacionaba con la pérdida de polaridad del citoesqueleto de actina.

El recuento de células expresando p110 α -CAAX con señal de [GFP-2xPH(PLC δ)] en la membrana plasmática a lo largo de un intervalo de tiempo de 8 horas reveló que la presencia del marcador en la membrana plasmática disminuía más de 5 veces transcurridas 3 horas de expresión de dicha proteína (Figura 26). A partir de este momento, se produjo el aumento en el porcentaje de células que presentaban *patches* de actina despolarizados en la yema emergente. Este porcentaje alcanzó su máximo a las 6 horas, cuando el 70% de las células expresando p110 α -CAAX presentaban despolarización del citoesqueleto, y se mantuvo en estos niveles hasta el final del análisis. El de marcaje de [GFP-2xPH(PLC δ)] en la membrana plasmática, disminuyó levemente desde las 3 horas hasta el final del análisis.

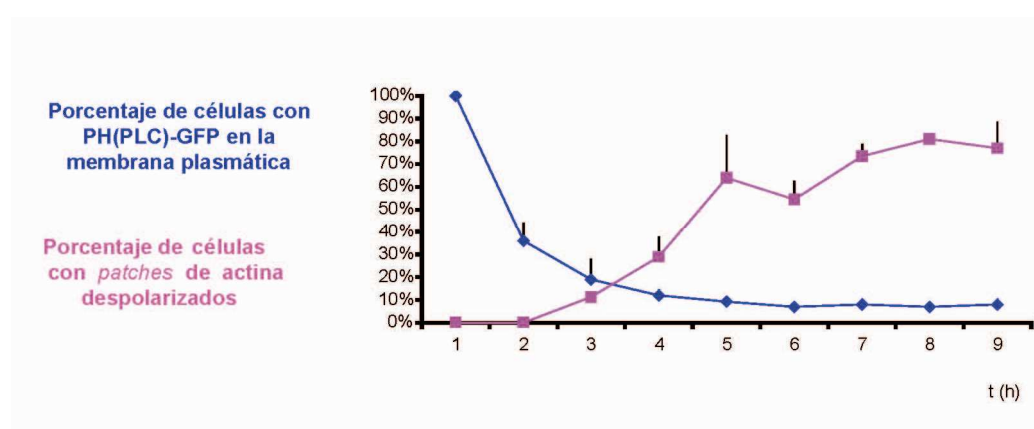


Fig. 26. Efecto de p110 α -CAAX sobre el citoesqueleto de actina y el reservorio de PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática. La gráfica representa en ordenadas el porcentaje de células y en abscisas el tiempo, en horas, desde el comienzo de la expresión de PI3K desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX. La línea azul muestra el porcentaje de células de un cultivo líquido en medio SG expresando p110 α -CAAX que contienen el marcador de PtdIns-4,5P₂ [GFP-2xPH(PLC δ)] (Yu *et al.*, 2004) en la membrana plasmática y la rosa el porcentaje de células del mismo cultivo que presentan *patches* de actina despolarizados en la yema emergente, teñidos con rodamina-faloidina.

Estos resultados muestran que la pérdida drástica del reservorio de PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática causada por expresión de PI3K ocasiona el aumento en la despolarización del citoesqueleto de actina en estas células, de acuerdo con la observación de que este reservorio es importante para su adecuada polarización (Desrivieres *et al.*, 1998). Además, este resultado refuerza la hipótesis de que la toxicidad de p110 α -CAAX se debe a la función esencial que ejerce el PtdIns-4,5P₂ en la secreción polarizada, el cual que no puede ser ejercido por el PtdIns-3,4,5P₃ generado.

Esto convierte a la expresión de la PI3K heteróloga en una herramienta para el estudio de las funciones esenciales del PtdIns-4,5-P₂ en *S. cerevisiae*.

3.3. La expresión de PI3K retarda el transporte endocítico de FM4-64 a la vacuola y altera la localización de la proteína Snc1

Los *patches* de actina son lugares donde se produce la endocitosis. Además, es conocida la importancia del PtdIns-4,5P₂ en el control de este proceso. Basándonos en trabajos previos realizados por nuestro equipo en los que se observó que la expresión de PI3K provocaba alteraciones en el tráfico endocítico (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005), decidimos caracterizar este proceso a través del seguimiento de la incorporación del colorante vital FM4-64 (Vida y Emr, 1995). Éste permite trazar la ruta endocítica, ya que se une a los lípidos de la membrana plasmática, se internaliza mediante endocitosis y se incorpora posteriormente a vesículas endocíticas, hasta su llegada a la membrana vacuolar. Como se puede ver en la Figura 27A, el tiempo que tarda este colorante en llegar a la membrana de la vacuola en una población silvestre es aproximadamente de 60 minutos, por lo que se evaluó el marcaje con FM4-64 de la membrana vacuolar a los 15, 30 y 60 minutos posteriores a la adición del colorante para precisar la dinámica de su incorporación en las células. En levaduras que expresaban p110 α -CAAX, el porcentaje de células en las cuales el marcaje del colorante se localizaba en su totalidad en la membrana vacuolar, era notablemente inferior al de las células expresando un vector vacío como control en todos los tiempos que se estudiaron (Figura 27A); de hecho, una hora después de la adición del FM4-64, éste había alcanzado la membrana vacuolar en el 100% de las células control, mientras que en las células expresando p110 α -CAAX solo lo había hecho en el 50% de las células, las cuales además contenían un elevado número de endosomas y estructuras membranosas marcadas con el colorante y presentaban un mayor número de vacuolas que las células control.

Snc1 es una proteína vSNARE que media la fusión de vesículas exocíticas con la membrana plasmática en levadura. Es constantemente endocitada y reciclada de nuevo a la membrana plasmática desde los endosomas tempranos a través del *trans*-Golgi, en el que se incorpora a nuevas vesículas secretoras (Lewis *et al.*, 2000). La localización de Snc1 se suele usar tanto para el estudio del proceso endocítico, dado que la presencia exclusiva o mayoritaria de esta proteína en la membrana plasmática indica un defecto en la endocitosis, como para el estudio del tráfico a través de su paso por los endosomas

y el aparato de Golgi al ser reciclada. Cuando se estudió la localización de Snc1 en células control expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R}, esta proteína se ubicaba en compartimentos citoplásmicos principalmente, así como en

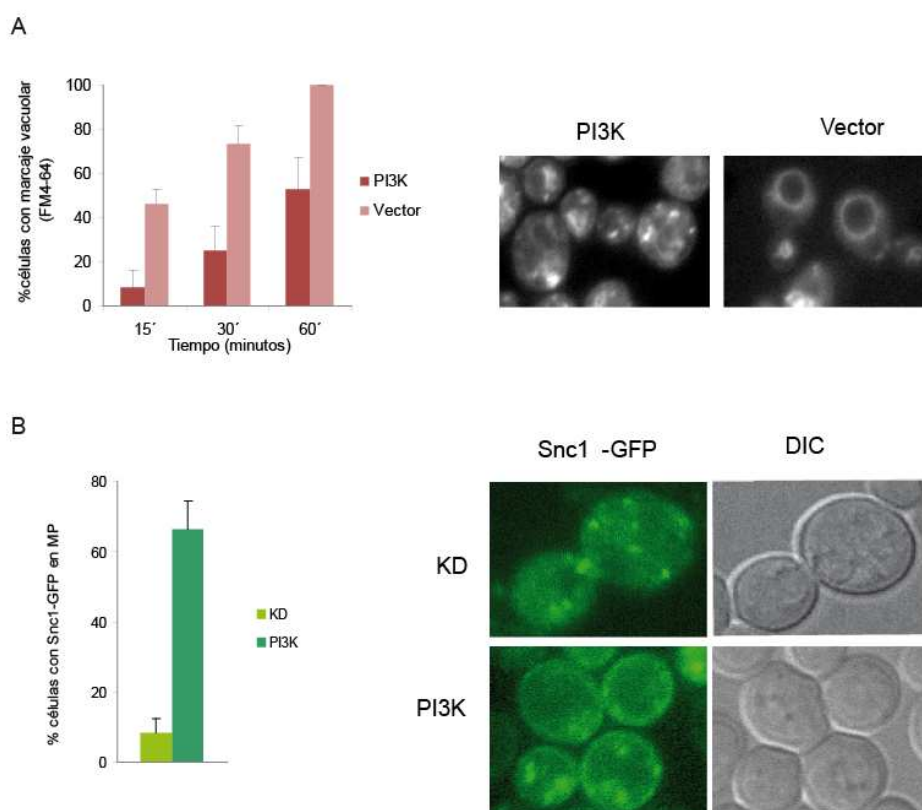


Fig. 27. Efecto de la expresión de PI3K sobre la endocitosis en la célula de levadura. (A) La gráfica representa el porcentaje de células ($N \geq 300$) expresando el plásmido vacío YCpLG o la subunidad catalítica p110 α -CAAX desde YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K), que presentan teñida la membrana vacuolar con el colorante vital FM4-64 a los 15, 30 y 60 minutos de la adición del colorante. Las imágenes de microscopía de fluorescencia a la derecha muestran el aspecto de las células a los 30 minutos de la adición del marcador. (B) La gráfica representa el porcentaje de células expresando un mutante catalíticamente inactivo de PI3K desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o la subunidad catalítica de PI3K desde YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) que contienen el marcador Snc1-GFP en la membrana plasmática ($N \geq 300$). A la derecha dos imágenes representativas de microscopía de fluorescencia del aspecto de las células co-expresando las proteínas indicadas (1ª columna) y de las mismas en microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) (2ª columna).

sitios de polaridad, como la yema emergente, de acuerdo con lo descrito para células silvestres (Lewis *et al.*, 2000). Sin embargo, en células expresando p110 α -CAAX activa, el marcador se situaba a lo largo de toda la membrana plasmática y de forma mucho más intensa, en más del 60% de las células, mientras que en el control esto solo se observaba en menos del 10% de la población (Figura 27B). Como observaciones co-laterales a estos

experimentos se observó que el tamaño de las vesículas intracelulares en que se localizaba Snc1 fue notablemente superior en células expresando p110 α -CAAX que en el control, sugiriendo que en estas condiciones existe además un defecto en el tráfico a través de la ruta endo-exocítica de reciclaje que sufre esta proteína.

Estos resultados ponen de manifiesto que en condiciones de eliminación de PtdIns-4,5P₂ existe un defecto en la vía endocítica de la levadura.

3.4. La expresión de PI3K produce defectos en la morfología vacuolar

Las observaciones con el colorante vital FM4-64 habían revelado anomalías en la vía endocítica degradativa y en el número de vacuolas en células que expresaban p110 α -CAAX. Para profundizar en el estudio de este efecto se emplearon diferentes marcadores que permitieron observar la morfología y apariencia de las vacuolas.

El CMAC (7-amino-4-clorometilcumarina) es un colorante fluorescente que atraviesa las membranas celulares y emite fluorescencia en condiciones de acidez; por tanto solo tiñe el lumen de la vacuola. Cuando se tiñeron las células expresando p110 α -CAAX con CMAC se apreció que el colorante, en lugar de encontrarse en un compartimento definido correspondiente a la vacuola tal como ocurría en células control expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R}, se distribuía en una serie de orgánulos con morfología irregular que se extendían por todo el citoplasma (Figura 28).

Posteriormente se empleó una proteína de fusión del receptor del factor α Ste2 a la proteína fluorescente mCherry. El factor α es un péptido mediante el cual las células haploides de tipo MAT α se comunican con las de tipo sexual opuesto MATa para generar proyecciones polarizadas dirigidas a la célula de la cual provino la señal y así aparearse con ellas. Su receptor, Ste2, es una proteína transmembranal que es regulada mediante su reciclaje a través de la vía endocítica de manera constitutiva cuando se encuentra unida a su ligando, por lo que es usada comúnmente como herramienta para trazar la endocitosis (Singer-Kruger *et al.*, 1993; Schandel y Jenness, 1994; Hicke *et al.*, 1997). Se ha descrito que una fusión C-terminal de Ste2 a GFP, además de localizarse en la membrana plasmática y en compartimentos endocíticos, se acumula en el lumen de la vacuola (Stefan y Blumer, 1999), dependiendo del ratio de internalización, la

degradación de GFP en este orgánulo y el número de copias del plásmido. En nuestro caso Ste2-mCherry se expresó desde un plásmido episómico, y dicha proteína de fusión se acumuló en las células control en el lumen vacuolar (Figura 28). Por el contrario, cuando se expresó p110 α -CAAX catalíticamente activa, el marcador Ste2-mCherry se localizó en unos compartimentos disgregados en el citoplasma, similares a los anteriormente observados con CMAC en estas células.

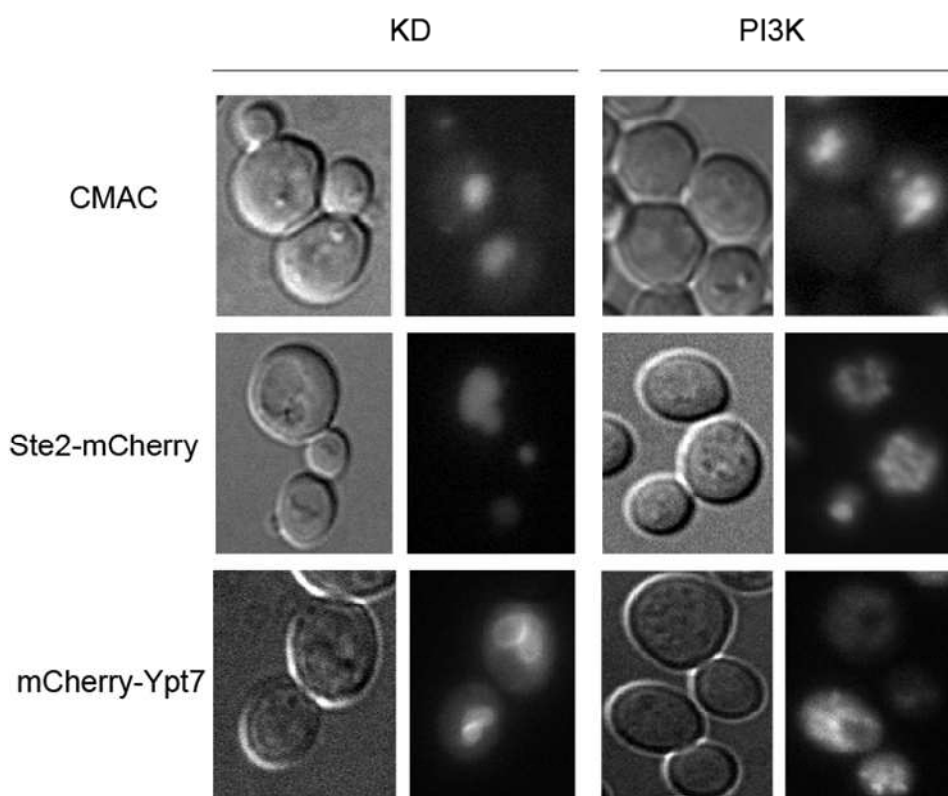


Fig. 28. Efecto de la expresión de PI3K sobre la morfología vacuolar. Imágenes de DIC (1ª y 3ª columna) y de microscopía de fluorescencia (2ª y 4ª columna) que muestran la morfología de las vacuolas de células expresando un mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o la subunidad catalítica p110 α -CAAX desde YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K). En la primera línea las células fueron teñidas con el colorante CMAC; en la segunda y en la tercera las células contienen además los plásmidos YEPlac112-Ste2-mCherry o pRS414-mCherry-Ypt7, respectivamente.

La proteína Ypt7 es la homóloga a la Rab GTPasa de mamíferos Rab7. En levadura Ypt7 coordina la maduración de los endosomas tardíos y su fusión con la vacuola en la vía degradativa (Epp *et al.*, 2011b). Al expresar esta proteína en fusión a mCherry en las células control, este marcador se localizó en la membrana vacuolar así como en compartimentos endosomales tardíos (Figura 28). Sin embargo la co-expresión con p110 α -CAAX produjo también la alteración de este patrón, causando la localización del

marcador tanto en la membrana como en el interior de los compartimentos vacuolares de morfología anormal previamente observados con CMAC y Ste2-mCherry.

Todas estas observaciones sugieren que la expresión de PI3K ocasiona defectos en la morfología y fusión de vacuolas.

3.5. La falta de PtdIns-4,5P₂ altera la morfología del trans-Golgi (TGN)

El aparato de Golgi de *S. cerevisiae* es un conjunto de cisternas membranosas que presenta un aspecto microscópico puntiforme. Se divide en *cis*-, medio o *trans*-, y se encarga de modificar postraduccionalmente proteínas procedentes del retículo endoplásmico en su parte *cis* o de coordinar el destino de las proteínas en la ruta secretora, en su parte *trans* (TGN), dado que intercambia tráfico con los endosomas tempranos, tardíos y con la vacuola, y envía vesículas secretoras a la membrana plasmática. Los defectos a nivel del tráfico intracelular en el TGN repercuten en anomalías tanto de la morfología vacuolar como del tráfico de determinadas proteínas a través de este orgánulo (Conibear y Stevens, 2000). La carencia de PtdIns-4,5P₂ inducida por expresión de p110 α -CAAX ha demostrado causar notables alteraciones en la morfología vacuolar y asimismo en la ruta de reciclaje que sigue la proteína Snc1 desde los endosomas tempranos hacia el *trans*-Golgi. Para determinar si la función y morfología de este orgánulo se veían comprometidas en estas circunstancias, decidimos estudiar la localización de una de las proteínas residentes en el TGN, la proteína Sec7 que presenta actividad GEF sobre las GTPasas Arf del aparato de Golgi. En las células control expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R}, Sec7 presentó un aspecto puntiforme, definido y bastante intenso (Figura 29) que se corresponde con el descrito para esta proteína (Franzoso *et al.*, 1991). Sin embargo en células expresando p110 α -CAAX, Sec7 mostró un patrón disperso y disgregado por toda la célula, incrementándose significativamente el número de puntos por célula marcados con esta proteína, aunque su tamaño era inferior al observado en las células control. Estos resultados indican que la expresión de p110 α -CAAX ocasiona una fragmentación del TGN.

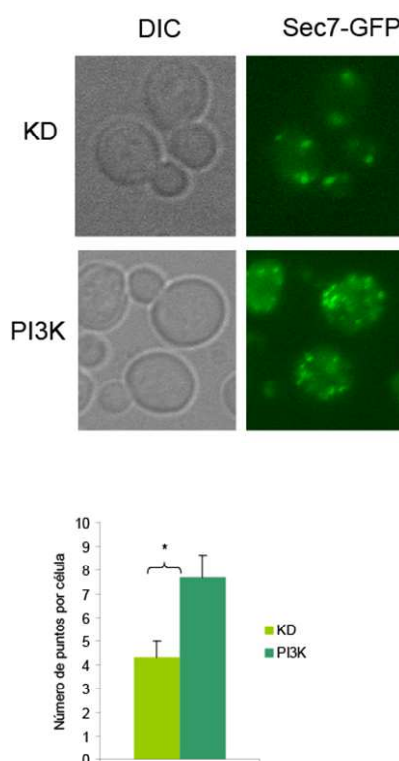


Fig. 29. Efecto de la expresión de PI3K sobre la morfología del TGN. En la parte superior, imágenes de microscopía de DIC (izquierda) y de fluorescencia (derecha) que muestran el aspecto del TGN de células de la cepa DLY35 (Sec7-GFP) expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) como control o p110 α -CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K). En la parte inferior, la gráfica muestra el número de puntos marcados con Sec7-GFP por célula (N=220) en cada caso (*p \leq 0.05).

3.6. La localización de los componentes del exocisto Exo70, Exo84, Sec6, Sec5 y Sec3 se encuentra alterada en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂

El exocisto es un complejo octamérico que se localiza en el extremo de la yema emergente o en la zona de separación entre la célula madre y la hija, donde tiene lugar un crecimiento más activo (Lipschutz *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012). Algunas de las subunidades del exocisto reconocen el PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática para efectuar el anclaje de las vesículas secretoras (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), por lo que el estudio de la localización del exocisto en condiciones de expresión de PI3K resultaba particularmente interesante. Estos experimentos se llevaron a cabo durante una estancia en el laboratorio del Dr. Guo (Universidad de Pennsylvania). Los componentes del exocisto Exo70, Exo84, Sec6, Sec5 y Sec3 observados en fusión GFP

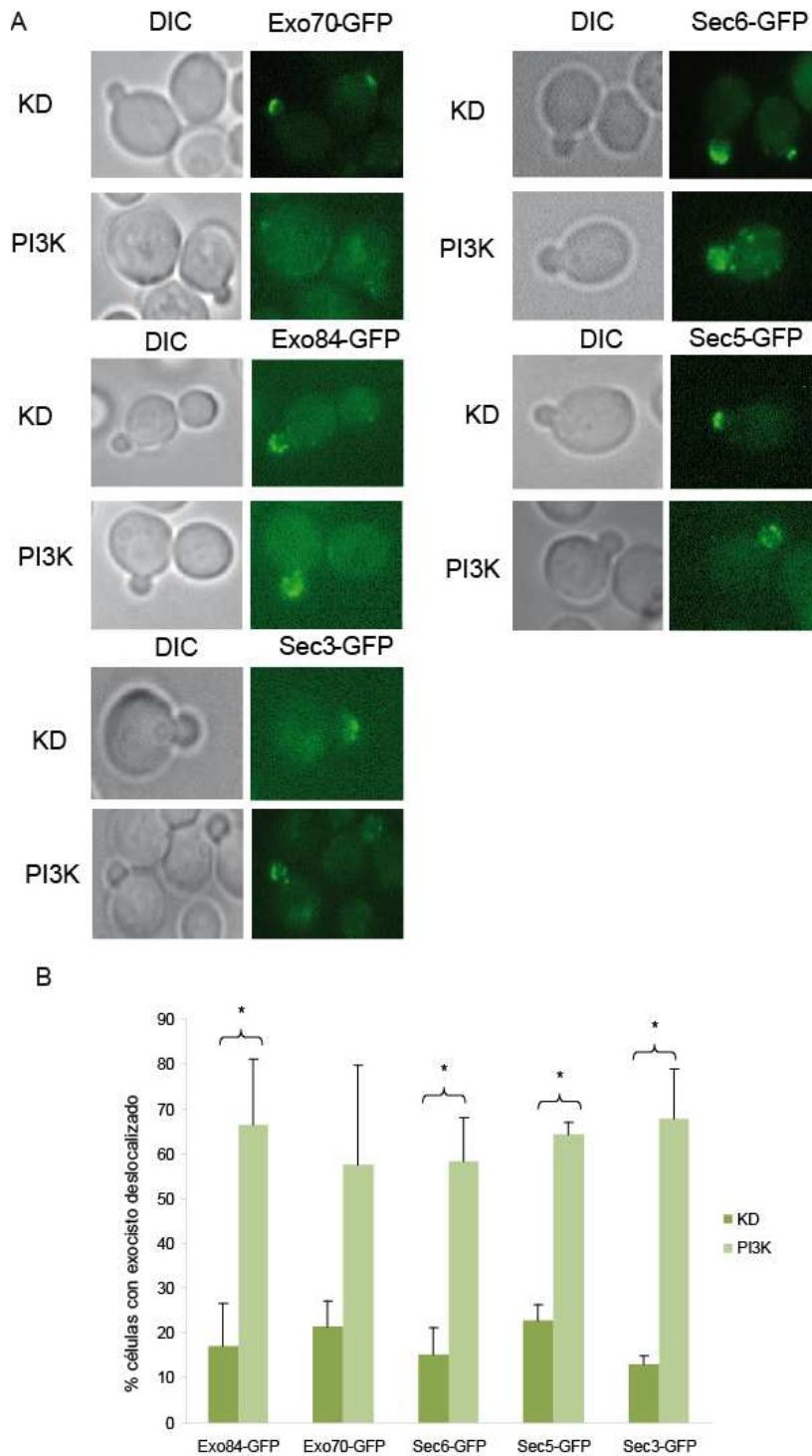


Fig.30. Localización del exocisto en células expresando PI3K. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia y DIC de células de las cepas GY2284 (Exo84-GFP), GY2285 (Exo70-GFP), GY2288 (Sec6-GFP), GY2287 (Sec5-GFP) y GY2286 (Sec3-GFP) expresando los plásmidos YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K). (B) La gráfica muestra el porcentaje de células de estos cultivos (N \geq 300) que presentaban defectos en el anclaje a la membrana plasmática de la yema de las distintas subunidades estudiadas; el recuento se llevó a cabo considerando solo células con una yema pequeña emergente en un cultivo asincrónico (*p \leq 0.05).

en células control expresando el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} presentaron una polarización totalmente restringida a la parte apical de la yema (Figura 30A), de acuerdo con lo descrito anteriormente en células silvestres (TerBush y Novick, 1995; Finger *et al.*, 1998; Lipschutz *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, las células expresando p110 α -CAAX presentaron alteraciones en el anclaje de estas proteínas a la membrana de la nueva yema, permaneciendo distribuidas de manera difusa por toda la yema (Figura 30A). El porcentaje de células con defectos en la fijación de las proteínas del exocisto a la parte apical de la yema fue significativamente mayor en células expresando p110 α -CAAX para el caso de las subunidades Exo84, Sec6, Sec5 y Sec3 (Figura 30B). Por tanto, la pérdida de PtdIns-4,5P₂ provocada por la expresión de p110 α -CAAX causa defectos en el anclaje del exocisto a la membrana de la yema emergente.

3.7. La falta de PtdIns-4,5P₂ inducida por expresión de PI3K causa la activación de la ruta CWI de *S. cerevisiae*

La ruta CWI es una cascada de señalización intracelular que se activa frente a estímulos y daños en la pared celular y en la membrana plasmática de la levadura y regula la expresión de genes que le permiten adaptarse a ellos. Se ha propuesto que el PtdIns-4,5P₂ ejerce un papel importante en la señalización mediada a través de esta ruta, a través de su interacción con la proteína GEF de Rho1, Rom2 (Audhya *et al.*, 2002). Sin embargo trabajos previos en nuestro grupo de investigación habían demostrado que la expresión de PI3K, que como hemos visto elimina el PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática, provoca una activación de la MAPK de la ruta CWI, Slt2 (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Por este motivo decidimos caracterizar más profundamente la activación de la ruta CWI que tiene lugar en estas condiciones y confirmar si verdaderamente suponen para la célula una agresión que ponga en marcha la respuesta adaptativa característica de la estimulación de esta ruta.

3.7.1. La expresión de PI3K provoca la fosforilación de Slt2, la MAPK de la ruta CWI, de manera sostenida en el tiempo

En primer lugar nos propusimos determinar la dinámica temporal de la activación de la MAPK de esta ruta, Slt2. Para ello, realizamos un análisis de la fosforilación de Slt2 en extractos de células expresando p110 α -CAAX durante un período de tiempo de 8 horas a

partir del momento de su inducción, utilizando anticuerpos fosfoespecíficos de la forma doblemente fosforilada y, por tanto activada, de la MAPK. Los niveles de fosforilación de Slt2 se incrementaron secuencialmente en el tiempo con respecto a la fosforilación basal en ausencia de expresión de p110 α -CAAX (Figura 31). Los valores más altos se alcanzaron al cabo de las cuatro horas de la inducción y se sostuvieron incrementados en el intervalo de tiempo analizado.

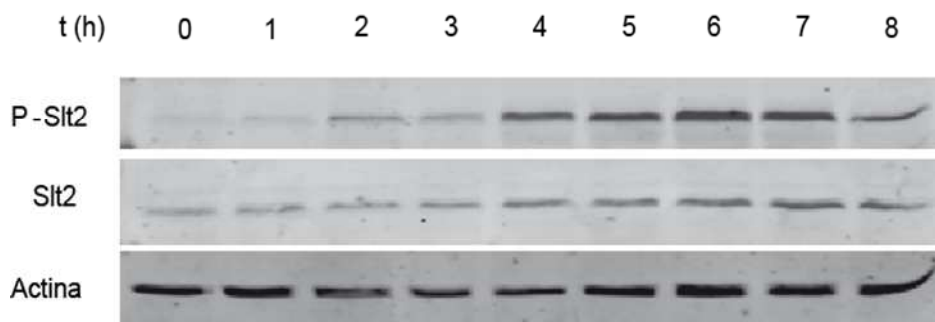


Fig. 31. Activación de la MAPK Slt2 por expresión de PI3K. *Western-blotting* de extractos de células de la cepa silvestre BY4741 (WT) expresando p110 α -CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX durante un período de tiempo de 8 horas, utilizando anticuerpos anti-phospho-p42/44, anti-Slt2 y anti-actina, como control de carga.

3.7.2. La fosforilación de la MAPK Slt2 se correlaciona con una activación de la respuesta transcripcional dependiente de la ruta CWI

Para verificar que la activación de la MAPK Slt2 que se estaba produciendo en condiciones de eliminación de PtdIns-4,5P₂ daba lugar a una reprogramación génica como respuesta a este estímulo, estudiamos la dinámica de dos marcadores de activación transcripcional de la ruta CWI. Uno de ellos es la fosforilación y aumento de la expresión del factor de transcripción Rlm1. En respuesta a estímulos de la ruta CWI, este factor de transcripción regula la expresión de determinados genes necesarios para que se produzca una respuesta transcripcional que le permita a la célula adaptarse a este estímulo (Jung y Levin, 1999). Se ha descrito que Rlm1 es capaz de activar la transcripción del gen *SLT2* (Jung *et al.*, 1999), así como de *RLM1* (Roberts *et al.*, 2000) ejerciendo de esta manera un efecto de retroalimentación positiva sobre la ruta. La inmunodetección de una versión etiquetada de Rlm1 mostró que en condiciones de expresión de PI3K se produce un aumento en la cantidad de este factor de transcripción en el tiempo, así como un pequeño cambio en su movilidad electroforética, debido a su fosforilación por Slt2, los cuales no se producen cuando se expresa el mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} como control (Figura 32A). Otro de los genes

regulados por Rlm1 es *MLP1*, el cual codifica una pseudoquinasa llamada Mlp1 (*Mpk-like protein*), que se expresa en respuesta a la activación transcripcional por parte de Slt2

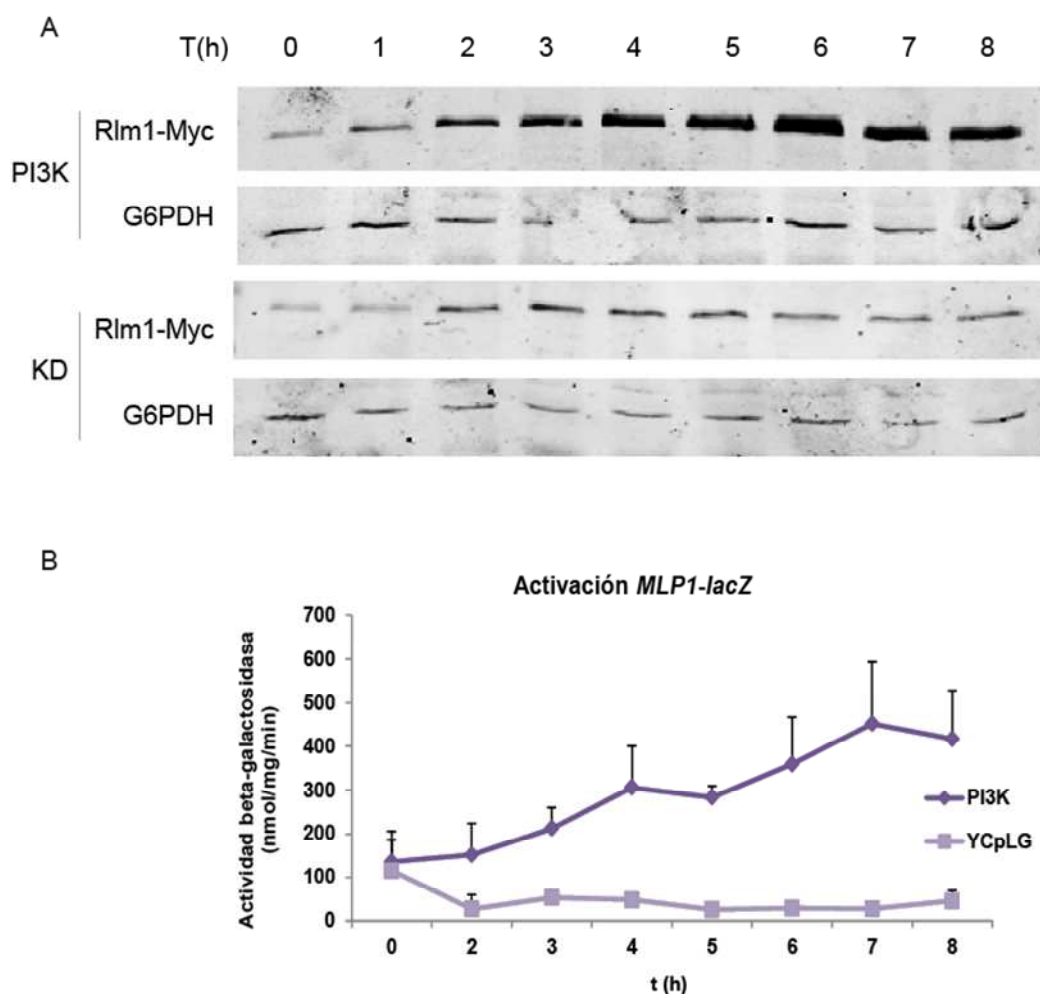


Fig. 32. Activación transcripcional de la ruta CWI en condiciones de expresión de PI3K. (A). *Western-blotting* de extractos de células de la cepa silvestre YMM1, que expresa desde su locus cromosómico una versión de Rlm1 fusionada con el epítipo Myc, expresando PI3K desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX o el mutante catalíticamente inactivo desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) durante un período de tiempo de 8 horas. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos frente al epítipo Myc y frente a G6PDH, como control de carga. (B) Valoración de la actividad beta-galactosidasa procedente de la expresión de *pMLP1-lacZ* en la cepa silvestre YPH499 transformada YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) o con un vector vacío (YCpLG) como control.

(Rodríguez-Pena *et al.*, 2008), por lo que se puede utilizar como un gen reportero de activación la ruta CWI. La actividad β -galactosidasa de una fusión constituida por el promotor de *MLP1* al gen *lacZ* en células expresando p110 α -CAAX fue notablemente superior a la de aquellas expresando un vector vacío en el período de tiempo analizado (Figura 32B). Estos resultados corroboran que la fosforilación de la MAPK inducida por las condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂, producidas por expresión de PI3K, es capaz

de generar una respuesta transcripcional dependiente de la ruta CWI que se mantiene en el tiempo.

3.7.3. El análisis transcriptómico de células expresando PI3K revela un patrón similar al que se obtiene en presencia de estímulos de la ruta CWI

Para conocer el perfil transcripcional global en respuesta a la expresión de PI3K realizamos experimentos de *microarrays* de DNA en los que se comparó la expresión diferencial de genes en células expresando p110 α -CAAX respecto al correspondiente mutante catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} como control. En estas condiciones se produjo la inducción de 80 genes al menos 1,7 veces más que en las células control ($p\text{-value}\leq 0,05$) y la represión de 7 genes al menos 0,6 veces menos que en las células control (Tabla 7). Estos genes se agruparon en categorías funcionales según las herramientas bioinformáticas *Genecodis* (Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009; Tabas-Madrid *et al.*, 2012) y *Go Term Finder* (<http://www.yeastgenome.org>, Stanford University, CA) (Figura 33).

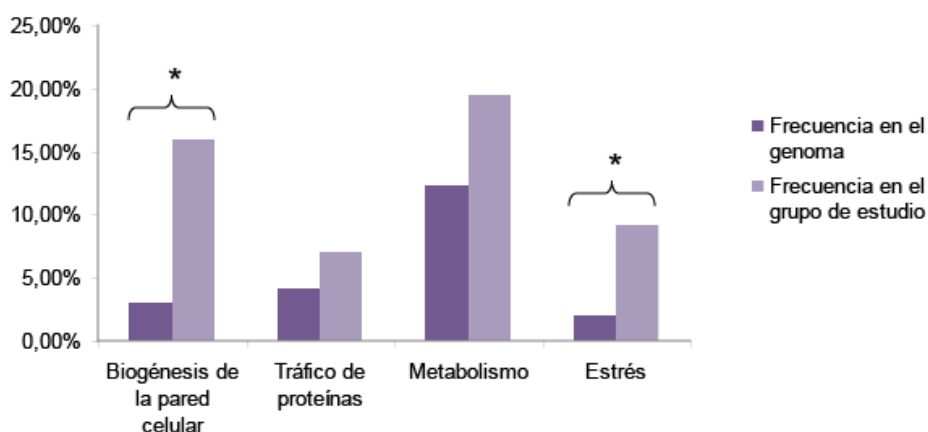


Fig. 33. Funciones celulares representadas en el perfil transcripcional obtenido por expresión de PI3K. El diagrama representa el porcentaje de genes relacionado con la biogénesis de la pared celular, el tráfico de proteínas, el metabolismo y el estrés, respectivamente en el genoma de *S. cerevisiae* y en el grupo de genes diferencialmente expresados en células expresando PI3K. El asterisco indica significación estadística según la prueba de Bonferroni ($p\leq 0,05$).

Según estas categorías se hallaron significativamente enriquecidos dos procesos, teniendo en cuenta el número total de genes relacionado con estos procesos de forma global en el genoma: “biogénesis de la pared celular” y “respuesta a estrés” con una

significación estadística del $1,3 \cdot 10^{-6}$ y de 0,05, respectivamente, según el *p-value* de Bonferroni. El 16% de los genes que se hallaron diferencialmente expresados en estas condiciones estaban relacionados con la biogénesis de la pared celular, mientras que en el genoma de *S. cerevisiae* solo un 3% de los genes está relacionado con este proceso; asimismo la respuesta inducida por PI3K presentaba un 9% de genes relacionados con estrés, en comparación con el 2% de los genes relacionados con este proceso en el genoma. Igualmente se encontró un enriquecimiento en genes relacionados con metabolismo y tráfico de proteínas, pero no de manera estadísticamente significativa.

Para verificar la validez de los datos del perfil transcripcional obtenido en condiciones de expresión de PI3K a partir de estos experimentos, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con genes representativos del análisis completo (Figura 34).

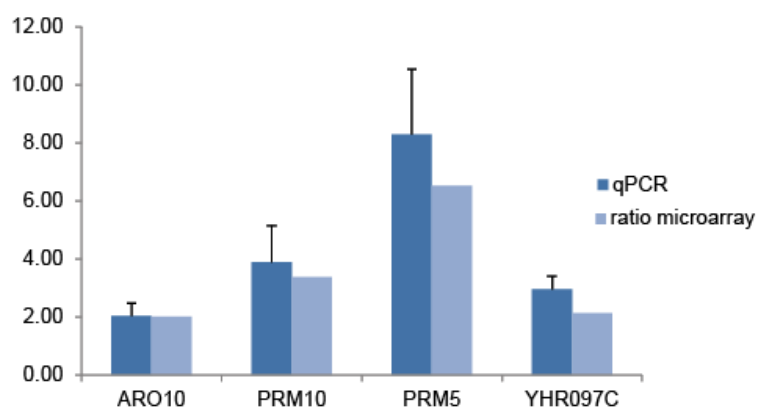


Fig. 34. Confirmación mediante qRT-PCR de los resultados obtenidos en los *microarrays* de DNA en condiciones de expresión de PI3K. La gráfica muestra en azul oscuro los valores de los niveles de inducción de 4 genes que se escogieron para realizar la confirmación mediante RT-PCR (qPCR), empleando como control interno el valor del gen *ACT*, y los valores que se obtuvieron inicialmente en los experimentos de *microarrays* (ratio) en azul claro.

Para ello se escogieron 4 genes que presentaron distintos valores de inducción en los primeros análisis, empleando los mismos mRNAs en ambos casos. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación se correlacionaron con los ratios que se obtuvieron inicialmente en los *microarrays* de DNA, lo cual valida los resultados transcriptómicos obtenidos.

A *priori*, un amplio grupo de los genes que se expresaban diferencialmente estaban significativamente relacionados con la biogénesis de la pared celular, por lo que decidimos verificar la similitud que existía entre el perfil transcripcional obtenido en condiciones de expresión de p110 α -CAAX y estímulos de la ruta CWI. Como era de esperar por los resultados de activación de Rlm1 y de expresión de *MLP1-lacZ*, el perfil transcripcional generado en estas condiciones coincide en gran medida con el generado en condiciones de estimulación de la ruta CWI (Figura 35), como el que se produce en mutantes carentes de proteínas necesarias para la síntesis de la pared celular (Fks1 y Gas1) (Lagorce *et al.*, 2003), el que se genera mediante la sobreexpresión de las proteínas Rho1 y Pkc1 (Roberts *et al.*, 2000) y los tratamientos con el agente reductor DTT (Gasch *et al.*, 2000), con factor α (Roberts *et al.*, 2000), con el compuesto rojo Congo, que induce daño en la pared celular por unirse a la quitina, y con la zimoliasa, que también induce daño en la pared celular al degradar algunos de sus componentes (Garcia *et al.*, 2004b).

La herramienta bioinformática *Genecodis* reveló que los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes diferencialmente expresados en condiciones de expresión de p110 α -CAAX son Rlm1, el principal factor de transcripción de la respuesta a estímulos de la ruta CWI, así como Sps18, Hot1, Gcr2, Sko1, Msn2, Pdr3 y Sfp1, de forma muy significativa (*p-value* de Bonferroni $\leq 10^{-8}$), entre otros que se detallan en la Tabla 8.

Además de los genes que se ven inducidos de forma común en la mayor parte de las condiciones de estimulación de la ruta CWI, existe un grupo (*YCL049C*, *PPM1*, *ARO10*, *YDR391C*, *AGX1*, *SDS24*, *MEI4*, *YHR022C*, *YLR031W*, *YKL091C*, *AIM17*, *STE3*, *ECM4*, *YBR053C*, *DCS2*, *YPS6*, *VPS73*, *YDC1*, *CAR1*, *UBI4*), que incluye varios genes con funciones muy dispares o de función desconocida que no se pueden agrupar en ninguna categoría, que se indujeron específicamente en condiciones de expresión de p110 α -CAAX. Este grupo no alcanzó valores de inducción tan elevados como los del grupo de genes característico de condiciones de estimulación de la ruta CWI. La herramienta bioinformática MARQ (Vazquez *et al.*, 2010) reveló que este grupo de genes se encuentra también inducido en situaciones de estrés térmico (Gasch *et al.*, 2000) (*p-value* <0,0001) así como en la transcripción dependiente de la proteína quinasa Tor2 (Mulet *et al.*, 2006) (*p-value* <0,0001), que coordina el crecimiento celular en respuesta

a estrés nutricional. Este grupo se encuentra regulado por el factor transcripcional de respuesta a estrés Msn2 ($p\text{-value}=1,3\cdot e^{-5}$) y por el factor transcripcional de choque térmico Hsf1 ($p\text{-value}=0,0025$).

En resumen, el estudio transcriptómico indica que la falta de PtdIns-4,5P₂ inducida por expresión de p110 α -CAAX desencadena una respuesta transcripcional relacionada con el daño de la pared celular y con el estrés, similar en gran medida a la que causan estímulos de la ruta CWI ya caracterizados, lo que indica que es percibido como un estímulo para esta vía de señalización.

Tabla 7. Clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en condiciones de expresión de PI3K. Los ORFs cuyos transcritos se indujeron al menos 1,7 veces o se reprimieron al menos 0,6 veces en presencia de PI3K y con respecto al control se agruparon funcionalmente en categorías según las herramientas bioinformáticas *Genecodis* y *Go Term Finder*. Los ratios corresponden al valor medio de inducción obtenido por triplicado con tres réplicas biológicas y todos los valores son estadísticamente significativos según la prueba t-Student ($p\leq 0,05$) aplicada para el análisis de los datos.

Grupo funcional	ORF	Gen	Ratio PI3K/KD	Descripción
Biogénesis de la pared celular	YIL117C	PRM5	6,53	Proteína regulada por feromona; inducida durante señalización a través de CWI
	YKL16W	PIR3	6,37	Proteína de la pared celular necesaria para su estabilidad
	YKL161C	MLP1	3,9	Protein quinasa inducida por la ruta CWI.
	YHR030C	SLT2	3,01	Serín-treonín MAP quinasa responsable del mantenimiento de la integridad celular
	YLR194C		2,84	Componente estructural de la pared celular
	YKR061W	KTR2	2,58	Manosiltransferasa que cataliza la glicosilación de proteínas
	YGR032W	GSC2	2,26	Subunidad catalítica de la beta -1,3 glucan sintasa
	YLR121C	YPS3	2,2	Proteína de la membrana plasmática
	YKL104C	GFA1	1,97	Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, participa en la biosíntesis de quitina
	YLR414C	PUN1	1,97	Proteína de la membrana plasmática relacionada con la integridad celular
	YKL096W	CWP1	1,89	Manoproteína de la pared celular
	YJL171C		1,84	Proteína de la pared celular de función desconocida
	YBR005W	RCR1	1,79	Proteína de la membrana del retículo endoplásmico implicada en la deposición de quitina
	YIR039C	YPS6	1,76	Proteína de la membrana plasmática
Tráfico de proteínas	YOR382W	FIT2	0,45	Manoproteína de la pared celular
	YBL078C	ATG8	2,39	Componente de los autofagosomas
	YDR358W	GGA1	1,96	Proteína del aparato de Golgi que interacciona con Arf1 y Arf2 para facilitar el tráfico a través del TGN
	YOR036W	PEP12	1,81	t-SNARE que permite la fusión de cargos incorporados en vesículas a la vacuola
	YNL093W	YPT53	1,75	GTPasa que participa en la ruta endocítica
Apareamiento	YGL104C	VPS73	1,74	Proteína de la mitocondria
	YHL028W	WSC4	0,44	Proteína de la membrana del RE que regula el anclaje de proteínas a la membrana del retículo
	YJL108C	PRM10	3,38	Proteína regulada por feromona
	YGR043C	NQM1	3,37	Transaldolasa de función desconocida; inducida por feromona

Resultados

Metabolismo	YDR085C	AFR1	2,27	Proteína necesaria para la formación del <i>shmoo</i> inducida por el tratamiento con feromona
	YGL053W	PRM8	1,84	Proteína regulada por feromona
	YHR209W	CRG1	6,14	Metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
	YGL157W	ARI1	3,5	Aldehído reductasa, NADPH-dependiente
	YLR174W	IDP2	2,67	NADP- isocitrato deshidrogenasa citosólica
	YDR380W	ARO10	2,00	Fenil-piruvato descarboxilasa
	YLR251W	SYM1	1,97	Proteína necesaria para el metabolismo etanólico; inducida por estímulo térmico
	YFL030W	AGX1	1,94	Alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT)
	YJL155C	FBP26	1,94	Fructosa-2,6-bisfosfatasa
	YGR213C	RTA1	1,91	Miembro de la familia de exportadores de lípidos en hongos
Estrés	YDR001C	NTH1	1,90	Trehalasa; puede estar relacionada con la resistencia a estrés
	YNL036W	NCE103	1,82	Anhidrasa carbónica
	YDR074W	TPS2	1,82	Subunidad fosfatasa del complejo trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa
	YKR076W	ECM4	1,80	Glutation transferasa
	YLR099C	ICT1	1,79	Aciltransferasa de ácido lisofosfatídico
	YPL087W	YDC1	1,73	Dihidroceramidasa alcalina; participa en el metabolismo de esfingolípidos
	YPL111W	CAR1	1,73	Arginasa
	YKL029C	MAE1	0,57	Enzima málica mitocondrial
	YMR189W	GCV2	0,56	Subunidad P del complejo glicina descarboxilasa
	YMR006C	PLB2	0,47	Fosfolipasa B
Señalización	YDR536W	STL1	4,35	Transportados de glicerol de la membrana plasmática; relacionada con estrés osmótico
	YDR171W	HSP42	2,68	Proteína pequeña de choque térmico (sHSP) con actividad chaperona
	YER037W	PHM8	2,2	Fosfatasa de ácido lisofosfatídico; relacionada con respuesta al ayuno de glucosa
	YDL022W	GPD1	2,04	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente; relacionada con estrés osmótico
	YPR005C	HAL1	2,02	Proteína citoplásmica que participa en la halotolerancia
	YMR140W	SIP5	1,80	Proteína de función desconocida relacionada con la respuesta al ayuno de glucosa
	YOR173W	DCS2	1,77	Proteína inducida por estrés
	YMR322C	SNO4	1,76	Posible chaperona y cisteín proteasa
	YOR134W	BAG7	2,89	Proteína activadora de la actividad GTPasa de Rho1 (RhoGAP)
	YMR104C	YPK2	2,87	Proteín quinasa que participa en la señalización en la ruta CWI
Otros	YGR161C	RTS3	2,55	Componente del complejo proteín fosfatasa tipo 2A (PP2A)
	YDR435C	PPM1	2,1	Carboxi metiltransferasa de la subunidad catalítica de PP2A
	YOR208W	PTP2	1,82	Proteín fosfatasa que inactiva la MAP quinasa Hog1
	YKL178C	STE3	1,81	Receptor acoplado a proteínas G para el factor a
	YKR091W	SRL3	4,66	Proteína citoplásmica que suprime la letalidad de una mutación <i>rad53</i>
	YHR087W	RTC3	2,62	Proteína de función desconocida implicada en el metabolismo del RNA
	YIL023C	YKE4	2,30	Transportador de zinc localizado en el RE
	YPR158W	CUR1	1,97	Regulador del control de calidad de la organización espacial de las proteínas
	YJL144W		1,95	Hidrofilina citoplásmica necesaria en el proceso de desecación y rehidratación
	YBR214W	SDS24	1,93	Proteína que participa en la separación celular durante la gemación
Otros	YER044C-A	MEI4	1,88	Proteína de meiosis que participa en la recombinación
	YOR306C	MCH5	1,85	Transportador de riboflavina de la membrana plasmática
	YKR046C	PET10	1,73	Proteína de función desconocida que co-purifica con partículas lipídicas
	YLL039C	UBI4	1,72	Ubiquitina
	YML123C	PHO84	0,42	Transportador de alta afinidad de fosfato inorgánico y de baja afinidad de manganeso
	YPR158W	CUR1	1,97	Regulador del control de calidad de la organización

Función desconocida	<i>YGR146C</i>	<i>ECL1</i>	1,94	espacial de las proteínas
	<i>YPL088W</i>		4,16	Relacionada con la prolongación del período de vida de la levadura
	<i>YOL047C</i>		2,88	
	<i>YPR078C</i>		2,33	
	<i>YLR042C</i>		2,17	
	<i>YHR097C</i>		2,13	
	<i>YCL049C</i>		2,12	
	<i>YKL107W</i>		1,95	
	<i>YDR391C</i>		1,95	
	<i>YJL107C</i>		1,94	
	<i>YHR022C</i>		1,86	
	<i>YJL082W</i>	<i>IML2</i>	1,85	
	<i>YLR031W</i>		1,85	
	<i>YKL091C</i>	<i>SFH1</i>	1,83	
	<i>YLR257W</i>		1,82	
	<i>YHL021C</i>	<i>AIM17</i>	1,82	
	<i>YDL057W</i>		1,81	
	<i>YBR053C</i>		1,78	
	<i>YLR413W</i>		0,59	

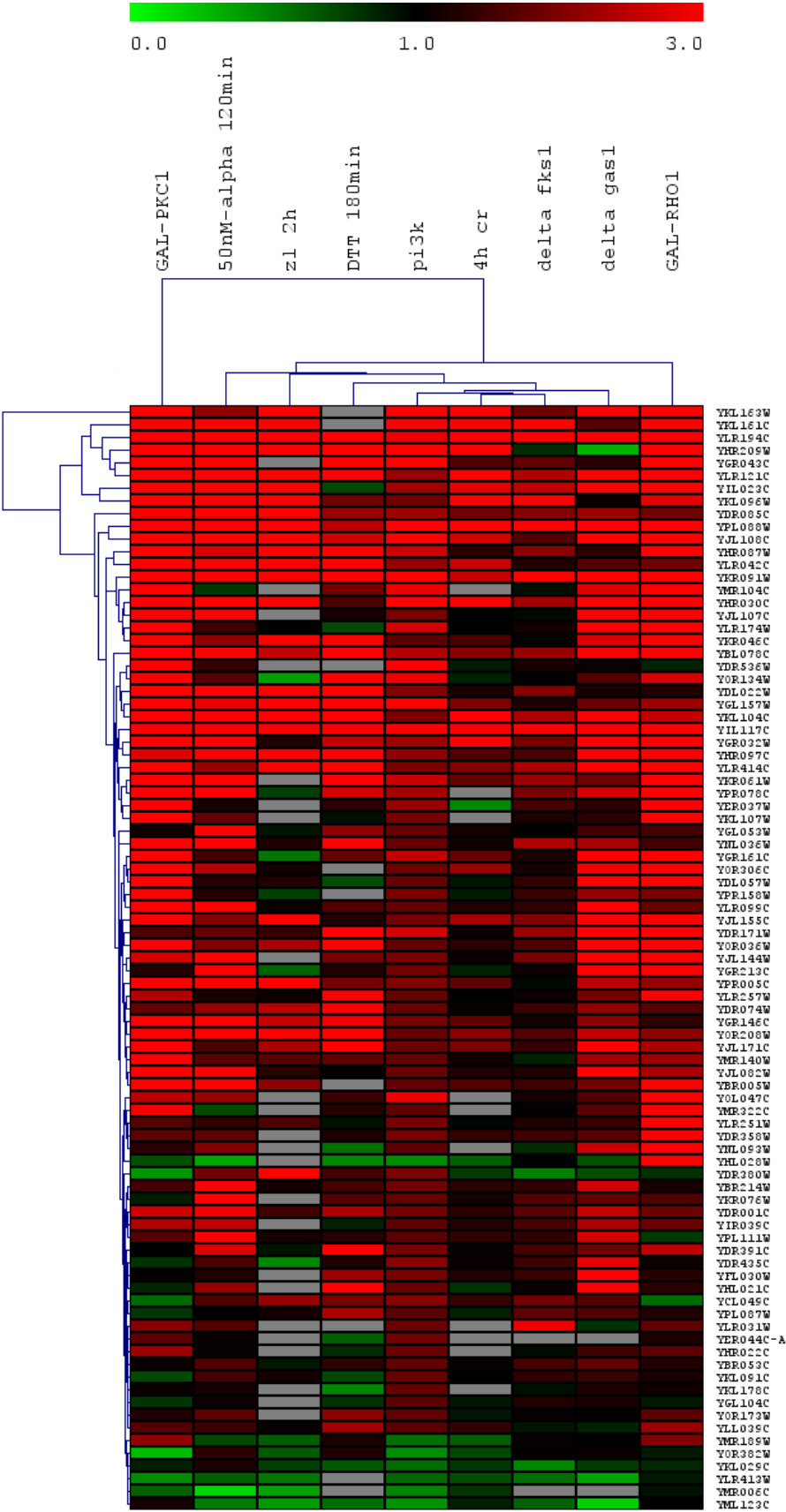


Fig. 35. Agrupamiento de perfiles de expresión transcripcional en distintas condiciones de activación de la ruta CWI, previamente descritos, en comparación con el perfil obtenido por expresión de p110 α -CAAX. Se muestran en las diferentes columnas los genes regulados diferencialmente en condiciones de expresión de PI3K frente a tratamientos con factor α (50mM- α 120min) (Roberts *et al.*, 2000), con zimoliasa (zl 2h) (Garcia *et al.*, 2004b), DTT (DTT 180min) (Gasch *et al.*, 2000), rojo Congo (4h cr) (Garcia *et al.*, 2004b); así como frente a la sobreexpresión de Pkc1 (GAL-PKC1) y de Rho1(GAL-RHO1) (Roberts *et al.*, 2000); y en mutantes en genes implicados en la biogénesis de la pared celular como *FKS1* (*delta fks1*) y *GAS1* (*delta gas1*) (Lagorce *et al.*, 2003). Cada fila representa el ratio de expresión para un gen en concreto en las diferentes condiciones indicadas en la parte superior de las columnas; cuando este valor se encuentra por encima de 1 el color es rojo y cuando está por debajo, verde; la saturación hacia rojo o hacia verde está indicada en la barra superior y depende de la magnitud del valor del ratio. El *clustering* se realizó con el *software* mEV. Las casillas en gris indican que falta el valor para ese gen en esa condición.

Tabla 8. Factores de transcripción relacionados significativamente con la regulación de determinados genes, dentro de aquellos que fueron diferencialmente expresados en los *microarrays* en condiciones de expresión de p110 α -CAAX. Para el análisis se emplearon las herramientas bioinformáticas disponibles en *Genecodis*. La relación entre los factores de transcripción y los genes que regulan, dentro de los que resultaron diferencialmente expresados, estaba previamente documentada, según las bases de datos. La tercera y cuarta columna muestran los porcentajes que el factor de transcripción regula en el grupo de genes diferencialmente expresados por PI3K y en el genoma completo de *S. cerevisiae*. La séptima columna (PB) indica el *p value* de Bonferroni para determinar la significación estadística en la asociación.

FT	ORF	Genes que regula en el genoma (%)	Genes que regula en el grupo (%)	Genes que regula en el grupo	Descripción	PB
Rlm1	YPL089C	1,90	35,26	YKE4, PRM5, YPL088W, YLR194C, MCH5, ATG8, FBP26, YPS3, KTR2, YHR097C, RTS3, YCL049C, YLR042C, CWP1, YJL171C, YPS6, HAL1, GFA1, PIR3, MLP1, SLT2, PRM10, PTP2, ARI1, SRL3, CRG1, AFR1, YJL107C, PUN1	Factor de transcripción que controla la expresión de genes relacionados con la organización de la pared celular y su biogénesis	0
Sps18	YNL204C	0,90	25	YPR078C, PRM5, ICT1, YKL107W, RTA1, RTS3, ECL1, PIR3, PHM8, MLP1, RTC3, YJL144W, PTP2, SRL3, CRG1, NQM1, ARO10, BAG7, NTH1, YJL107C	Proteína implicada en la regulación de la esporulación	0
Hot1	YMR172W	0,20	10	NCE103, STL1, YLR042C, TPS2, RTC3, NQM1, GPD1, YJL107C	Proteína que regula la expresión de genes en respuesta a alta osmolaridad	0
Gcr2	YNL199C	2,00	28,75	NCE103, PRM8, YLR194C, STE3, YPS3, YKL091C, KTR2, HSP42, RTS3, ECL1, YPS6, TPS2, PIR3, GSC2, PRM10, YHR022C, ARI1, SRL3, YDR391C, GPD1, NTH1, YJL107C, PUN1	Activador transcripcional de genes implicados en glicólisis	0
Sko1	YNL167C	2,60	32,50	NCE103, PRM5, PRM8, YPS3, STL1, HSP42, SNO4, RTS3, YLR042C, CWP1, HAL1, TPS2, PIR3, PHM8, PRM10, RTC3, DCS2, AGX1, YHR022C, ARI1, ECM4, NQM1, GPD1, NTH1, AFR1, YJL107C	Proteína relacionada con respuesta a estrés oxidativo y osmótico	0
Msn2	YMR037C	7,90	55	NCE103, VPS73, IML2, YLR194C, ATG8, FBP26, STL1, YKL091C, KTR2, HSP42, SNO4, RTS3, YLR042C, CWP1, YJL171C, YPS6, RCR1, TPS2, GFA1, YLR257W, PIR3, SYM1, PHM8, MLP1, MEI4, PPM1, RTC3, AIM17, DCS2, CAR1, AGX1, SIP5, YJL144W, ARI1, SDS24, YBR053C, YDR391C, ECM4, NQM1, GPD1, CUR1, NTH1, UBI4, PUN1	Activador transcripcional en respuesta a condiciones de estrés	0
Pdr3	YBL005W	2,10	23,75	PRM5, YPL088W, ICT1, IML2, YLR194C, HSP42, RTA1, RTS3, YLR042C, TPS2, PHM8, GSC2, RTC3, AIM17, DCS2, CAR1, ARI1, SDS24, ARO10	Factor transcripcional de la familia PDR (<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>)	0
Sfp1	YLR403W	8,00	53,75	YPK2, YPR078C, PRM5, YOL047C, YPL088W, VPS73, ICT1,, YDL057W,	Proteína que regula la transcripción de	0

				YLR194C, MCH5, STE3, STL1, KTR2, YHR097C, SNO4, PET10, YCL049C, YLR042C ECL1, CWP1, RCR1, HAL1, GFA1, YLR257W, PIR3, SYM1, PHM8, MLP1, GSC2, PRM10, RTC3, AIM17, CAR1, AGX1, ARI1, YBR053C, CRG1, YDR391C, PEP12, NQM1, CUR1, NTH1, UBI4	proteínas ribosomales y genes biosíntesis en respuesta a nutrientes, estrés, daño en el DNA y crecimiento celular.	
Crz1	YNL027W	4,00	31,25	YOL047C, PRM8, ICT1, YLR194C, YPS3, YHR097C, HSP42, RTA1, YPT53, RTS3, YJL171C, RCR1, TPS2, YLR257W, GSC2, AIM17, DCS2, YJL144W, ARI1, YDC1, PEP12, ARO10, BAG7, CUR1, PUN1	Activador de la expresión de genes de respuesta a estrés	$4 \cdot 10^{-20}$
Pdr1	YGL013C	4,60	33,75	YPK2, NCE103, PRM5, YPL088W, VPS73, ICT1, IML2, YLR194C, YPS3, YKL091C, HSP42, RTA1, RTS3, YLR042C, ECL1, CWP1, YPS6, TPS2, SYM1, PHM8, SLT2, RTC3, AIM17, DCS2, ARI1, YBR053C, NQM1	Factor transcripcional de la familia PDR (Pleiotropic Drug Resistance)	$9 \cdot 10^{-20}$
Ste12	YHR084W	10,60	55	NCE103, PRM5, YPL088W, VPS73, PRM8, ICT1, YLR194C, MCH5, STE3, YPS3, YKL091C, KTR2, YHR097C, HSP42, RTS3, YCL049C, YLR042C, ECL1, CWP1, YPS6, HAL1, GFA1, YLR257W, PIR3, PHM8, MEI4, GSC2, PRM10, CAR1, AGX1, YHR022C, SIP5, YJL144W, YBR053C, SRL3, ECM4, NQM1, ARO10, GPD1, CUR1, UBI4, AFR1, YJL107C, PUN1	Activador transcripcional de genes de apareamiento o crecimiento filamentoso	$2 \cdot 10^{-16}$
Gis1	YDR096W	3,00	23,75	PRM5, YDL057W, YKL091C, YHR097C, SNO4, YPS6, PIR3, SYM1, PHM8, RTC3, DCS2, AGX1, YHR022C, YJL144W, IDP2, ARI1, SRL3, CRG1, GPD1	Regula genes durante el ayuno de nutrientes	$4 \cdot 10^{-15}$
Msn4	YKL062W	6,90	33,75	NCE103, VPS73, YLR194C, ATG8, KTR2, HSP42, YPS6, RCR1, TPS2, GFA1, SYM1, PHM8, MEI4, GSC2, RTC3, AIM17, DCS2, CAR1, AGX1, ARI1, YDR391C, ECM4, NQM1, GPD1, NTH1, UBI4, AFR1	Activador de la expresión de genes de respuesta a estrés	$1 \cdot 10^{-9}$
Stp2	YHR006W	4,10	23,75	PRM5, YLR031W, ICT1, YPS3, STL1, HSP42, SNO4, RTS3, CWP1, YPS6, PIR3, GSC2, ARI1, SRL3, CRG1, YDR391C, ECM4, NQM1, ARO10	Factor de transcripción que regula la expresión de aminoácido permeasas	$3,3 \cdot 10^{-9}$
Hsf1	YGL073W	8,30	37,50	YKE4, PRM5, VPS73, PRM8, YDL057W, IML2, ATG8, YKL091C, HSP42, PET10, RTS3, YLR042C, GGA1, ECL1, CWP1, YPS6, PIR3, SYM1, PHM8, RTC3, AIM17, YJL144W, SDS24, YBR053C, CRG1, ECM4, NQM1, BAG7, CUR1, UBI4	Factor de transcripción de choque térmico	$3,5 \cdot 10^{-9}$

3.7.4. La transmisión de la señal provocada por la expresión de PI3K se lleva a cabo a través de los elementos de la ruta CWI Wsc1, Rom2, Rho1 y Pkc1

Para completar la caracterización de la activación de la ruta CWI por la expresión de PI3K, decidimos estudiar qué elementos de la ruta CWI estaban implicados en la transmisión de este estímulo. Para ello se evaluaron los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 en condiciones de expresión de p110 α -CAAX o del correspondiente mutante

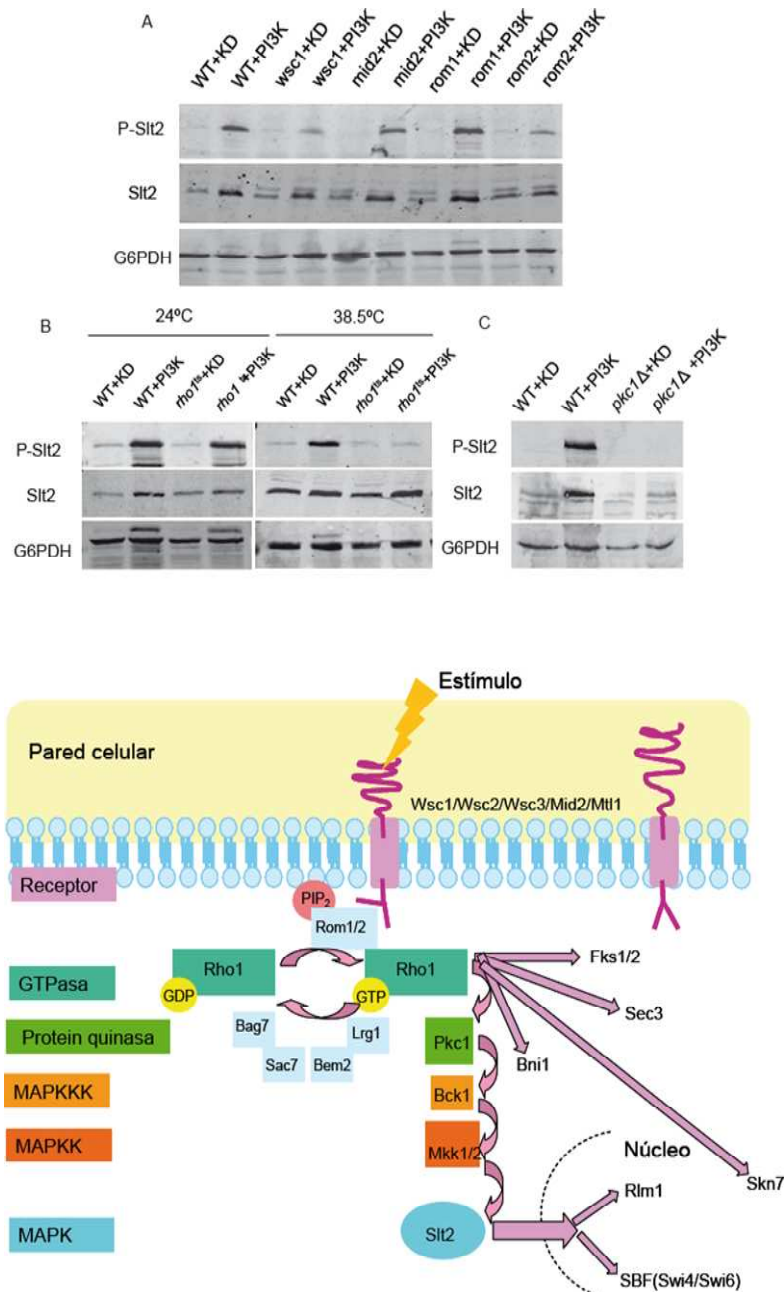


Fig. 36. Implicación de los componentes de la ruta CWI en la activación de la MAPK Slt2 por expresión de PI3K. *Western-blotting* de extractos de células de la cepa silvestre BY4741 (WT), de las cepas isogénicas mutantes Y01784 (*wsc1Δ*), Y05241 (*mid2Δ*), Y04700 (*rom1Δ*) y Y05280 (*rom2Δ*) (A), de la cepa silvestre OHNY (WT) y de la cepa isogénica HNY21 que expresa un alelo termosensible *rho1^{ts}* (B), y de la cepa silvestre BY4741 (WT) y un mutante isogénico *pkc1Δ* (C); todas ellas expresaban PI3K desde el plásmido YCpLG-PI3Kα-CAAX o el mutante catalíticamente inactivo, desde el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD), y se incubaron en medio SG a temperaturas permisivas (24°C) o restrictivas (38°C) en el caso de la versión termosensible de Rho1. En los experimentos en que se empleó el mutante *pkc1Δ* se adicionó una cantidad de sorbitol 0,3M, tanto a los cultivos de levaduras silvestres como a los de levaduras mutantes. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos anti-phospho-p42/44, anti-Slt2 y anti-G6PDH, como control de carga.

catalíticamente inactivo p110 α -CAAX^{K802R} como control, en una cepa silvestre y en cepas mutantes que carecían de los genes que codificaban distintas proteínas pertenecientes a la ruta CWI como las GEFs de Rho1, Rom1/2, la proteína quinasa Pkc1 y los sensores Wsc1 y Mid2, así como en una cepa que portaba un alelo termosensible de la GTPasa esencial Rho1. En los extractos de la cepa silvestre la expresión de PI3K provocó un incremento en la fosforilación de Slt2 (Figura 36A), en concordancia con los resultados obtenidos previamente. Sin embargo en los extractos que procedían de los mutantes *rom2 Δ* , *wsc1 Δ* (Figura 36A), de la cepa que expresaba un alelo termosensible de Rho1 (Figura 36B) y de la cepa mutante *pkc1 Δ* (Figura 36C) se apreció una disminución de la fosforilación de Slt2 en condiciones de expresión de p110 α -CAAX, en comparación con los niveles que presentaba la cepa silvestre. Ello indica que el sensor Wsc1, la GEF Rom2, la GTPasa Rho1 y la proteína quinasa Pkc1 participan en la transmisión de la señal de activación a través de la ruta CWI desencadenada por la actividad de p110 α -CAAX.

3.7.5. La falta del receptor Wsc1 y de la GEF Rom2 atenúa la inhibición de crecimiento ejercida por PI3K

Se sabe que la hiperactivación de la ruta CWI ocasiona la inhibición del crecimiento de la levadura (Mattison *et al.*, 1999), por lo que nos planteamos si la activación de dicha ruta estaría contribuyendo a la inhibición del crecimiento causada por la expresión de p110 α -CAAX. Con este objetivo estudiamos el crecimiento en condiciones de expresión de p110 α en mutantes carentes de algunos de los componentes de la ruta. Para ello empleamos la versión de p110 α que porta una señal de miristoilación, dado que ejerce una inhibición parcial del crecimiento y permite apreciar efectos de supresión o de agravamiento de este fenotipo que se podrían producir al expresar PI3K en estos mutantes (apartado 2.2).

Cuando esta versión se expresó en los mutantes *wsc1 Δ* y *rom2 Δ* , carentes respectivamente del receptor Wsc1 y la GEF de Rho1, Rom2, la inhibición del crecimiento se vio parcialmente atenuada con respecto a la observada en la cepa silvestre (Figura 37). Este efecto no ocurrió en los mutantes carentes de dos proteínas del módulo de MAPK, Bck1 y Slt2, en los que el crecimiento fue incluso levemente menor que en la cepa silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto que los elementos Wsc1 y Rom2 participan en la inhibición del crecimiento mediada por p110 α en levadura. Sin embargo no parece que sea la respuesta mediada por Slt2 la responsable de la toxicidad causada por PI3K.

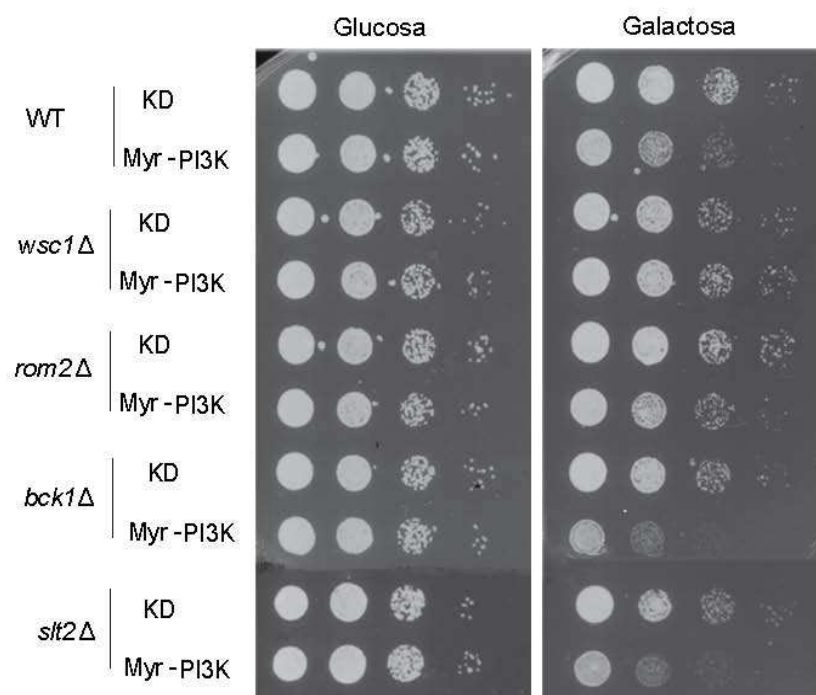


Fig. 37. Efecto de la expresión de PI3K en mutantes carentes de distintos componentes de la ruta CWI. Diluciones seriadas decimales en medio con SD (glucosa) y SG (galactosa) de levaduras de la cepa silvestre BY4741 y de las cepas mutantes isogénicas Y01784, Y05280, Y01328 y Y00993 expresando los plásmidos YCpLG-Myr-PI3KαQ (Myr-PI3K) o YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) como control.

3.8. La expresión de PI3K altera la localización de Pkc1 y provoca su aparición en endosomas de reciclaje

3.8.1. Pkc1 se localiza en puntos citoplasmáticos en presencia de PI3K, de forma dependiente del citoesqueleto de actina

El PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática es importante para la localización de la proteína Rom2 en los lugares de crecimiento polarizado (Audhya *et al.*, 2002), donde se produce la activación de la ruta CWI. Sin embargo, los resultados expuestos previamente ponen de manifiesto que, paradójicamente, en condiciones de ausencia de este fosfoinosítido inducidas por expresión de PI3K se produce también una activación de la ruta CWI. Decidimos estudiar la localización, la proteína quinasa Pkc1, que es reclutada específicamente a los lugares donde se produce activación de Rho1, en condiciones basales sin estimulación externa, en presencia de estímulos de la ruta CWI ya caracterizados y en condiciones de expresión de p110α-CAAX.

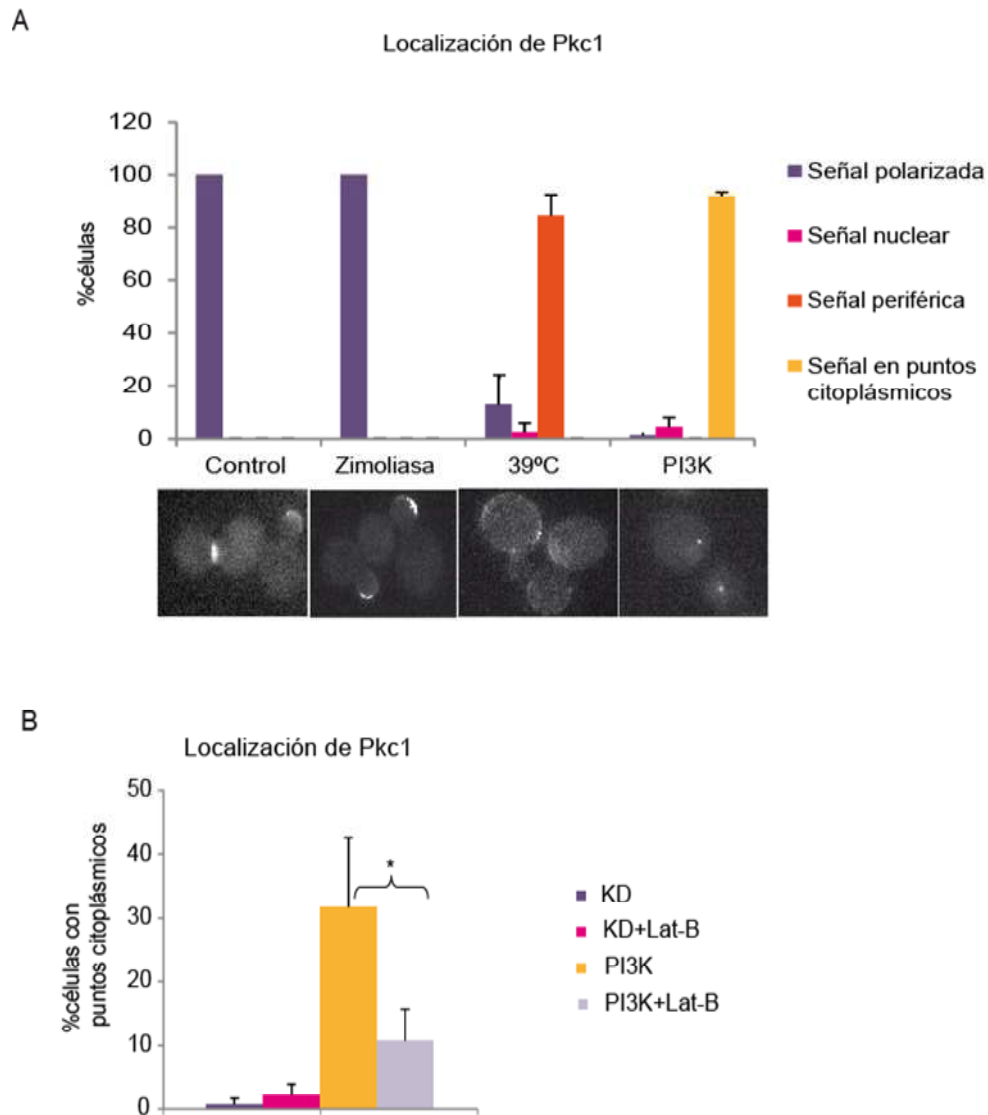


Fig.38. La localización de Pkc1 en células expresando p110 α -CAAX difiere de la inducida por otros estímulos de la ruta CWI y requiere de la función de actina. (A) Localización de Pkc1-GFP en células silvestres de la cepa MML550 en medio SG que expresan la fusión Pkc1-GFP desde su *locus* cromosómico transformadas con el plásmido vacío YCpLG e incubadas a 24°C (control), tratadas con zimoliasa 100T 0,8 U/mL (zimoliasa) durante 2 horas, incubadas a 39°C durante 1 hora o expresando p110 α -CAAX desde el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX. La gráfica muestra el porcentaje de células de estos cultivos (N=300) que presentaban respectivamente una localización polarizada, nuclear, periférica o en puntos citoplásmicos, y las imágenes de microscopía de fluorescencia ilustran lo que se corresponde con estas categorías. (B) Localización de Pkc1-GFP en células de la cepa silvestre YPH499 transformadas con el plásmido pVD67 (Pkc1-GFP) y con el plásmido YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o con YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K), cultivadas en medio SG y tratadas con Lat-B 150 μ M o con el solvente como control, durante 4 horas. La gráfica indica el porcentaje de células con puntos citoplásmicos (N \geq 300, *p \leq 0,05).

En condiciones basales a 24°C, Pkc1 se localizó en sitios de crecimiento polarizado en la parte apical de las yemas y en el septo de separación que se forma entre la célula madre y la célula hija (Figura 38A), de forma dependiente del ciclo celular como ya ha sido descrito (Andrews *et al.*, 2000; Denis *et al.*, 2005). Cuando se sometió a la célula a un tratamiento con zimoliasa, Pkc1 permaneció polarizada en la parte apical de las yemas en crecimiento, si bien mostró una señal más intensa que en condiciones basales de estimulación, lo que está de acuerdo con la necesidad de un refuerzo de la biosíntesis de la pared celular de las zonas más débiles. Frente a un estrés térmico a 39°C, que también provoca la estimulación de CWI, Pkc1 perdió su localización polarizada y se distribuyó simétricamente por toda periferia celular, tal como había sido descrito para otros elementos de la ruta en estas condiciones (Delley *et al.*, 1999). La observación microscópica de esta proteína en células expresando p110 α -CAAX reveló que, en estas circunstancias, Pkc1 se ubicaba en unos puntos citoplasmáticos de naturaleza desconocida, en lugar de presentar alguna de las localizaciones antes mencionadas (Figura 38A).

Posteriormente quisimos determinar si la formación de estos puntos citoplásmicos de Pkc1 inducidos por expresión de PI3K precisaban de un citoesqueleto de actina funcional, esencial en el proceso endocítico, en el transporte intracelular de vesículas y en el mantenimiento de la polaridad celular. Con este objetivo, se trató a las células con latrunculina B, un compuesto que se une a los monómeros de actina impidiendo su polimerización y que, en consecuencia, altera las citadas funciones celulares. El tratamiento con este compuesto produjo una disminución significativa en el número de puntos citoplásmicos de Pkc1 en células expresando p110 α -CAAX, en comparación con las células expresando PI3K que no habían sido tratadas con este compuesto (Figura 38B). Estos resultados parecen indicar que el citoesqueleto de actina contribuye a que se generen los puntos en los que se localiza Pkc1 en condiciones de expresión de p110 α -CAAX.

3.8.2. Los puntos en los que se localiza Pkc1 se asocian con compartimentos marcados con FM4-64

La morfología de los compartimentos en que se acumula Pkc1 en condiciones de expresión de PI3K y la dependencia del citoesqueleto de actina para su formación hacían sospechar que se trataba de compartimentos relacionados con tráfico vesicular. Para probar esta hipótesis llevamos a cabo estudios de co-localización con el fluorocromo FM4-64 en las células tras 15, 30 y 60 minutos de su adición.

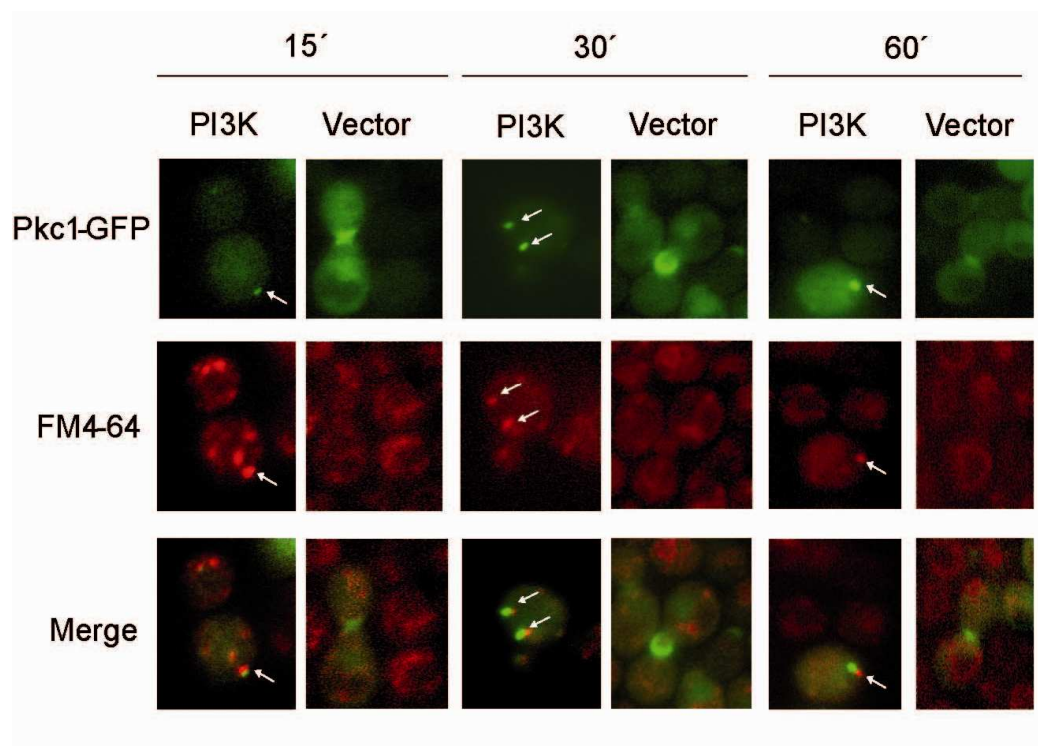


Fig.39. Co-localización de Pkc1 expresada desde el plásmido pVD67 (Pkc1-GFP) con el colorante FM4-64 en células de la cepa silvestre YPH499 transformadas con YcpLG (vector) o con YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) cultivadas en medio SG durante 5 horas, a los 15, 30 y 60 minutos posteriores a la adición del colorante.

Como se aprecia en la Figura 39, en células expresando p110 α -CAAX (PI3K) Pkc1 permaneció asociada a endosomas marcados con FM4-64 en todos los tiempos analizados, a diferencia de lo que sucedió en células expresando un vector vacío, en las que Pkc1 presentó una localización polarizada y el colorante alcanzó la membrana de la vacuola en un tiempo muy inferior, tal como habíamos caracterizado en el apartado 3.3. El recuento, realizado a los 30 minutos posteriores a la adición de FM4-64, reveló que en el 81 \pm 8% de las células (N>300) que contenían puntos de Pkc1 se apreciaba una

asociación con endosomas marcados con este colorante, lo que sugiere que estos compartimentos se han generado por endocitosis de la membrana plasmática.

3.8.3. Los compartimentos en los que se localiza Pkc1 no coinciden con marcadores de la ruta endocítica degradativa

Cuando un cargo es endocitado en la membrana plasmática se fusiona con vesículas endocíticas tempranas para dar lugar a endosomas tempranos. Si el cargo que contienen va a ser degradado continuará su recorrido a lo largo de la ruta endocítica, pasando a formar parte de endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares y llegando en último término a la vacuola. Los compartimentos en los que Pkc1 se localiza se han generado a partir de la endocitosis de la membrana plasmática de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, por lo que podrían estar siguiendo el recorrido hacia la vacuola a través de la ruta endocítica degradativa, lo cual estudiamos mediante el estudio de diversos marcadores de estos compartimentos.

Los endosomas tempranos se caracterizan por la presencia de la GTPasa Vps21 y del complejo de “*tethering*” CORVET, que a través de las subunidades Vps3 y Vps8, interacciona con Vps21 (Peplowska *et al.*, 2007; Epp *et al.*, 2011). En condiciones de expresión de p110 α -CAAX, Pkc1 no fue coincidente con Vps21, Vps3 ni Vps8 (Figura 40).

El proceso de maduración de los endosomas en su camino hacia la vacuola implica la adquisición de la GTPasa Ypt7, que dirige el tráfico de los endosomas tardíos y su fusión con la vacuola así como el tráfico retrógrado desde éstos hacia el aparato de Golgi vía el complejo retrómero de cargos que deben ser reciclados (Epp *et al.*, 2011). En último término, la intervención de diversas SNAREs, como la vSNARE Pep12, coordinan la fusión de los endosomas tardíos a la membrana de las vacuolas así como el tráfico retrógrado desde éstos al aparato de Golgi (Becherer *et al.*, 1996; Burd *et al.*, 1997; Gerrard *et al.*, 2000). Cuando se produjo la expresión de p110 α -CAAX, los compartimentos en que se localizaba Pkc1 tampoco coincidieron con Ypt7 ni con Pep12 (Figura 41).

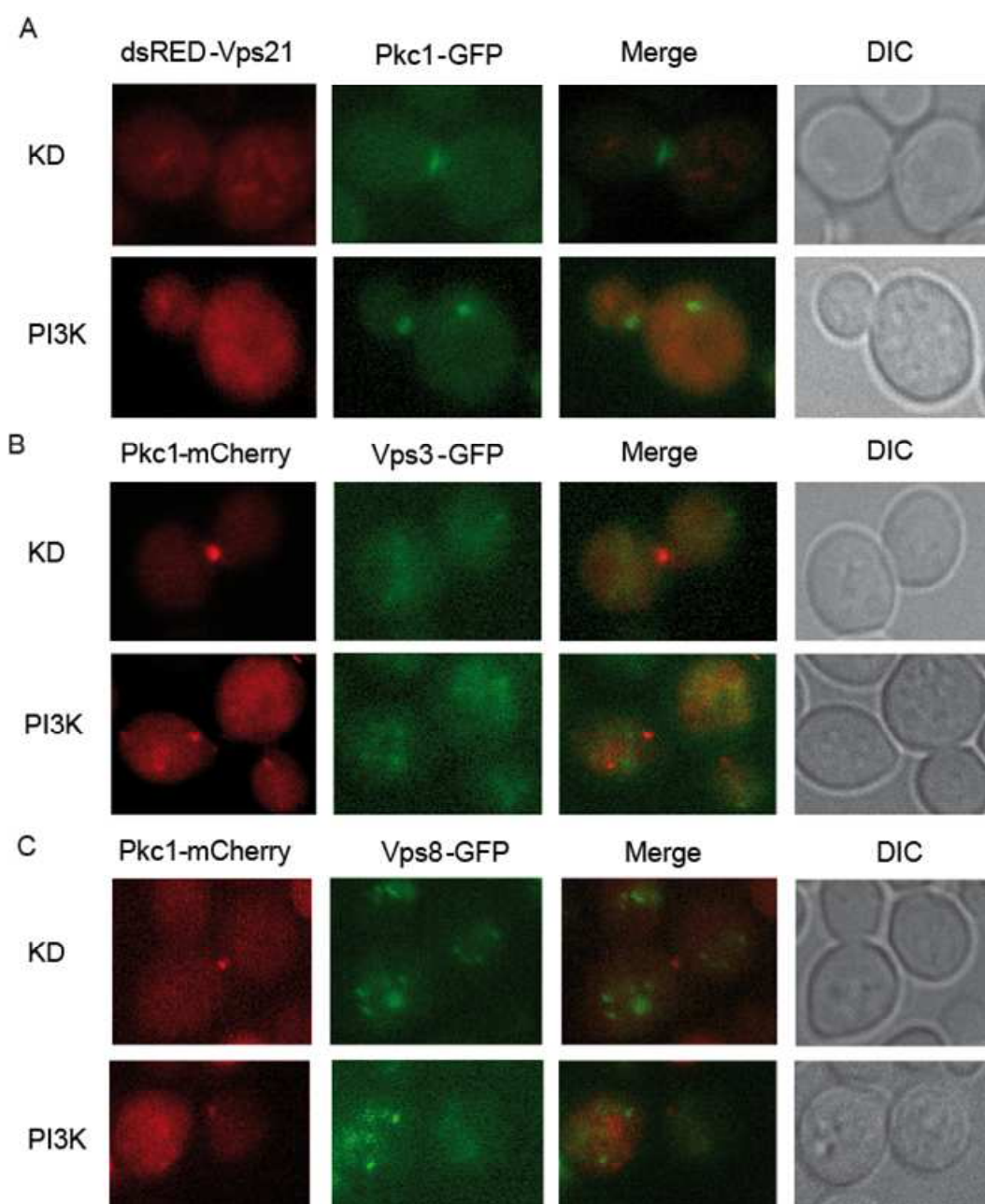


Fig. 40. Localización de los marcadores de endosomas tempranos y de Pkc1 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) o DIC (4ª columna). (A) Localización de Pkc1-GFP en células silvestres de la cepa MML550 que expresan Pkc1-GFP desde su *locus* cromosómico, co-transformadas con el mutante catalíticamente inactivo YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD), o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) y con el plásmido pRS414-dsRED-Vps21. (B) y (C) Células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con el mutante catalíticamente inactivo YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX y con los plásmidos pRS415-Vps3-GFP y pRS415-Vps8-GFP, respectivamente, y pVD67-Pkc1-mCherry.

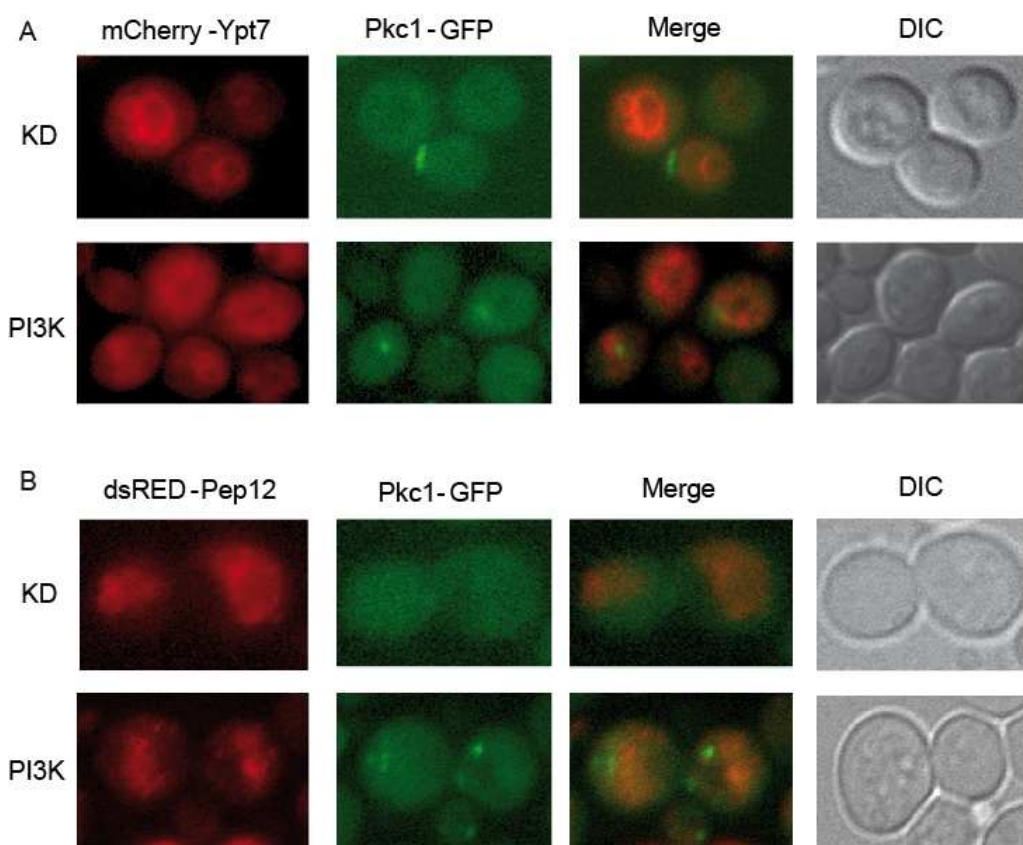


Fig. 41. Localización de los marcadores de endosomas tardíos y de Pkc1 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) o DIC (4ª columna). Las células de la cepa MML550 silvestres expresan Pkc1-GFP desde su *locus* cromosómico, se co-transformaron con el mutante catalíticamente inactivo YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD), o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) y con el plásmido pRS414-mCherry-Ypt7 (A) y pRS414-drRED-Pep12 (B).

Se ha descrito que la fusión de una etiqueta al extremo C-terminal de la proteína Snf7, una de las cuatro subunidades del complejo ESCRT-III, provoca la aparición de endosomas tardíos anormales llamados compartimentos de clase E. Estos compartimentos aparecen en mutantes *vps* de clase E, que se caracterizan por presentar un bloqueo en la salida de los cargos de compartimentos prevacuolares hacia la vacuola, y por ello generan un compartimento prevacuolar de gran tamaño que contiene proteínas de la ruta endocítica y de la vacuola (Raymond *et al.*, 1992; Conibear y Stevens, 1998; Teis *et al.*, 2008). Pkc1 tampoco coincidió con los compartimentos de clase E en que los que se ubica Snf7-mCherry en células expresando p110 α -CAAX (Figura 42A).

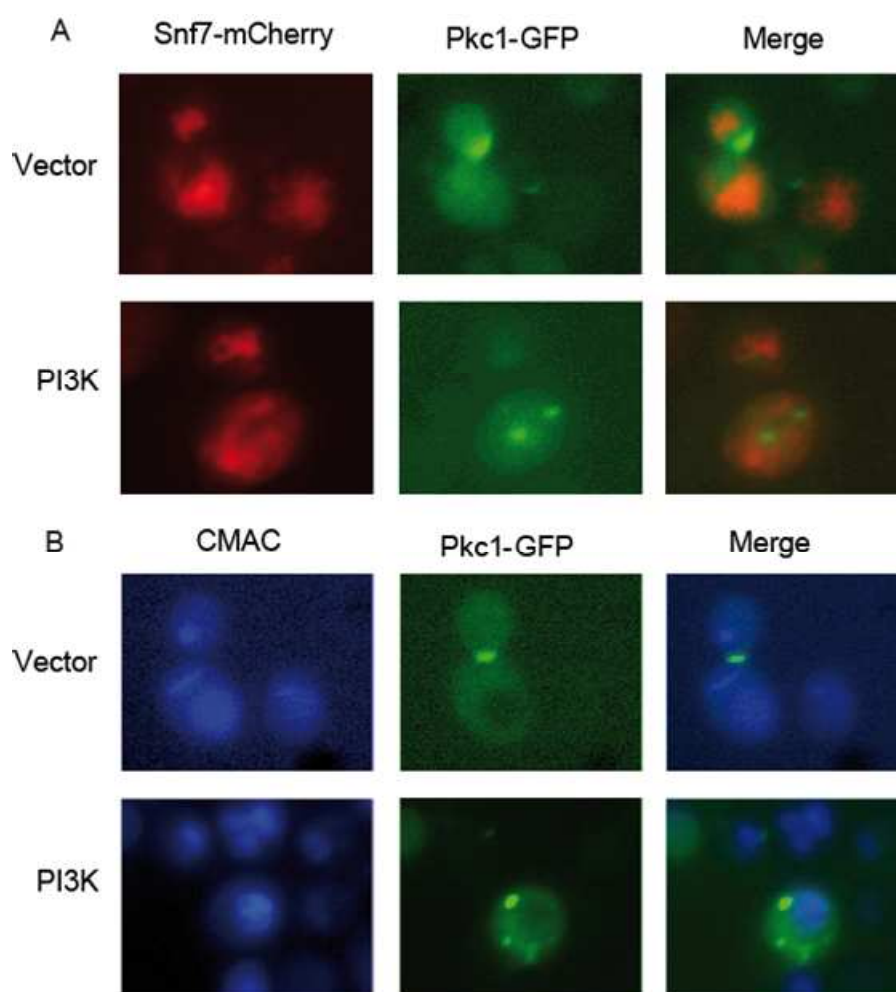


Fig.42. (A) Localización de Pkc1 y del marcador de endosomas tardíos Snf7 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia. Células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con el vector vacío YCpLG o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) y con los plásmidos YEPlac112-Snf7-mCherry y pVD67 (Pkc1-GFP). (B) Localización de Pkc1 en células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con el vector vacío YcplG o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K) y con el plásmido pVD67 (Pkc1-GFP), y teñidas con el colorante CMAC.

Por último, quisimos descartar una posible asociación de los compartimentos en que se localiza Pkc1 con la vacuola. Para ello empleamos el colorante CMAC, que como se comentó en el apartado 3.4 solo emite fluorescencia en entornos ácidos, como el lumen de la vacuola. Los puntos de Pkc1 generados en presencia de p110 α -CAAX tampoco mostraron una asociación con los compartimentos teñidos con CMAC (Figura 42B).

Todas estas evidencias indican que los compartimentos de naturaleza endosomal teñidos con FM4-64 en los que se localiza Pkc1 en condiciones de expresión de PI3K no

coinciden con estructuras características del tránsito hacia la vacuola por la ruta degradativa endosomal.

3.8.4. Pkc1 no co-localiza con marcadores del aparato de Golgi

El aparato de Golgi de *S. cerevisiae* es un conjunto de cisternas que presenta aspecto puntiforme. Dado que los compartimentos en que se localiza Pkc1 presentan asimismo morfología puntiforme decidimos observar la localización de dos marcadores correspondientes a la partes *cis* y *trans* de este orgánulo. Primeramente estudiamos la localización de la subunidad del complejo alfa-1,6 manosiltransferasa, Anp1, que glicosila las proteínas de nueva síntesis en el *cis*-Golgi (Hashimoto y Yoda, 1997).

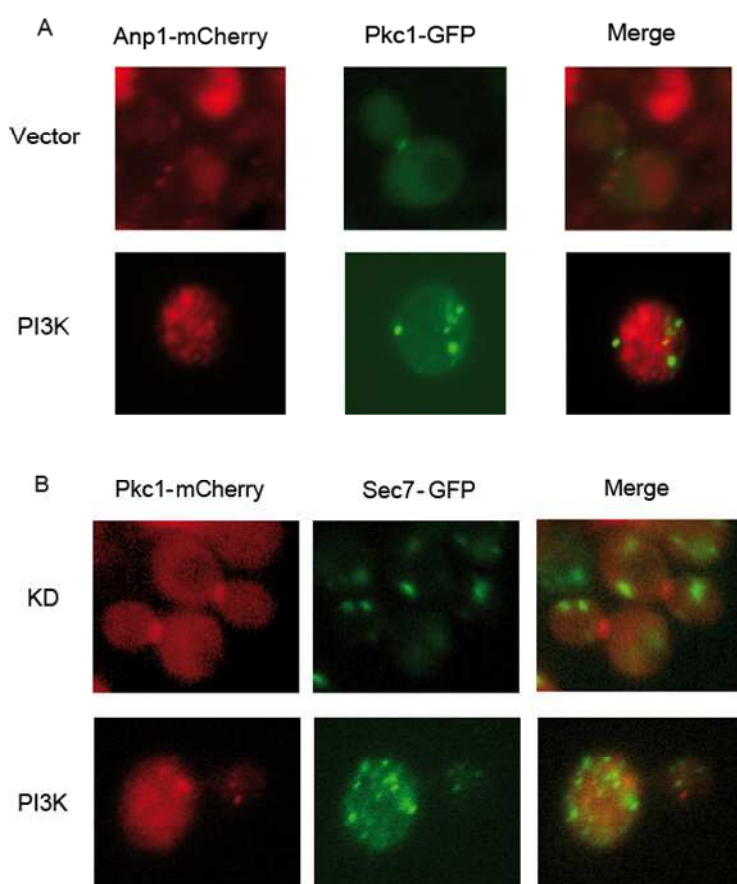


Fig. 43. Localización de marcadores del aparato de Golgi y de Pkc1 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia. (A) Células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con un vector vacío (YCpLG) o con el plásmido YCpLG-PI3K α -CAAX y con los plásmidos YEPlac112 Anp1-mCherry, que codifica el marcador de *cis*-Golgi Anp1, y pVD67 (Pkc1-GFP), cultivadas en medio SG. (B) Células de la cepa DLY35 (Sec7-GFP) co-transformadas con los plásmidos PVD67-Pkc1-mCherry y YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-PI3K α -CAAX (PI3K).

En células expresando p110 α -CAAX, Pkc1 no co-localizó con compartimentos marcados con esta proteína, lo que indicaba que los compartimentos en que se localizaba Pkc1 no procedían de síntesis proteica *de novo* y, por tanto, no se ubicaban en el *cis* Golgi (Figura 43A). Estos resultados eran previsibles teniendo en cuenta la co-localización que Pkc1 presentó con los endosomas marcados con FM4-64 (Apartado 3.8.2).

Posteriormente estudiamos la localización de la proteína Sec7 que se localiza en el *trans*-Golgi (TGN) (Figura 43B). En células expresando p110 α -CAAX, como ya se describió en el apartado 3.5, Sec7 presentó un aspecto más difuso y disgregado; la localización de este marcador tampoco coincidió con la de Pkc1, lo que indica que los compartimentos que observamos en presencia de PI3K no contienen proteínas del aparato de Golgi.

3.8.5. Pkc1 coincide con las Rab GTPasas Ypt31 e Ypt32 en condiciones de eliminación de PtdIns-4,5-P₂

El tráfico de membranas es muy complejo y puede existir intercambio de material desde los endosomas, tanto tempranos como tardíos, y el TGN, desde el cual puede producirse el reciclaje de cargos de nuevo hacia la membrana plasmática. Puesto que Pkc1 no coincide con ningún marcador de la ruta endocítica degradativa a pesar de co-localizar con FM4-64, estos compartimentos podrían corresponderse con endosomas tempranos relacionados con procesos de reciclaje. La ruta de reciclaje de cargos desde endosomas tempranos hacia la membrana plasmática ha sido caracterizada en levadura, e implica la participación de las Rab GTPasas Ypt31 e Ypt32, homólogas de Rab11 en mamíferos. Éstas se localizan en el *trans*-Golgi donde regulan la salida de vesículas secretoras del TGN (Jedd *et al.*, 1997) y su tránsito hacia la exocitosis a través de la interacción con la miosina Myo2 (Lipatova *et al.*, 2008); pero también están implicadas en el reciclaje de cargos que proceden de los endosomas tempranos a través del aparato de Golgi mediante su interacción con la proteína *F-box* Rcy1 (Chen *et al.*, 2005), la cual es un componente de los complejos ubiquitin ligasa. Decidimos estudiar si en estos compartimentos donde se ubicaba Pkc1 se encontraban también las Rab GTPasas Ypt31 e Ypt32.

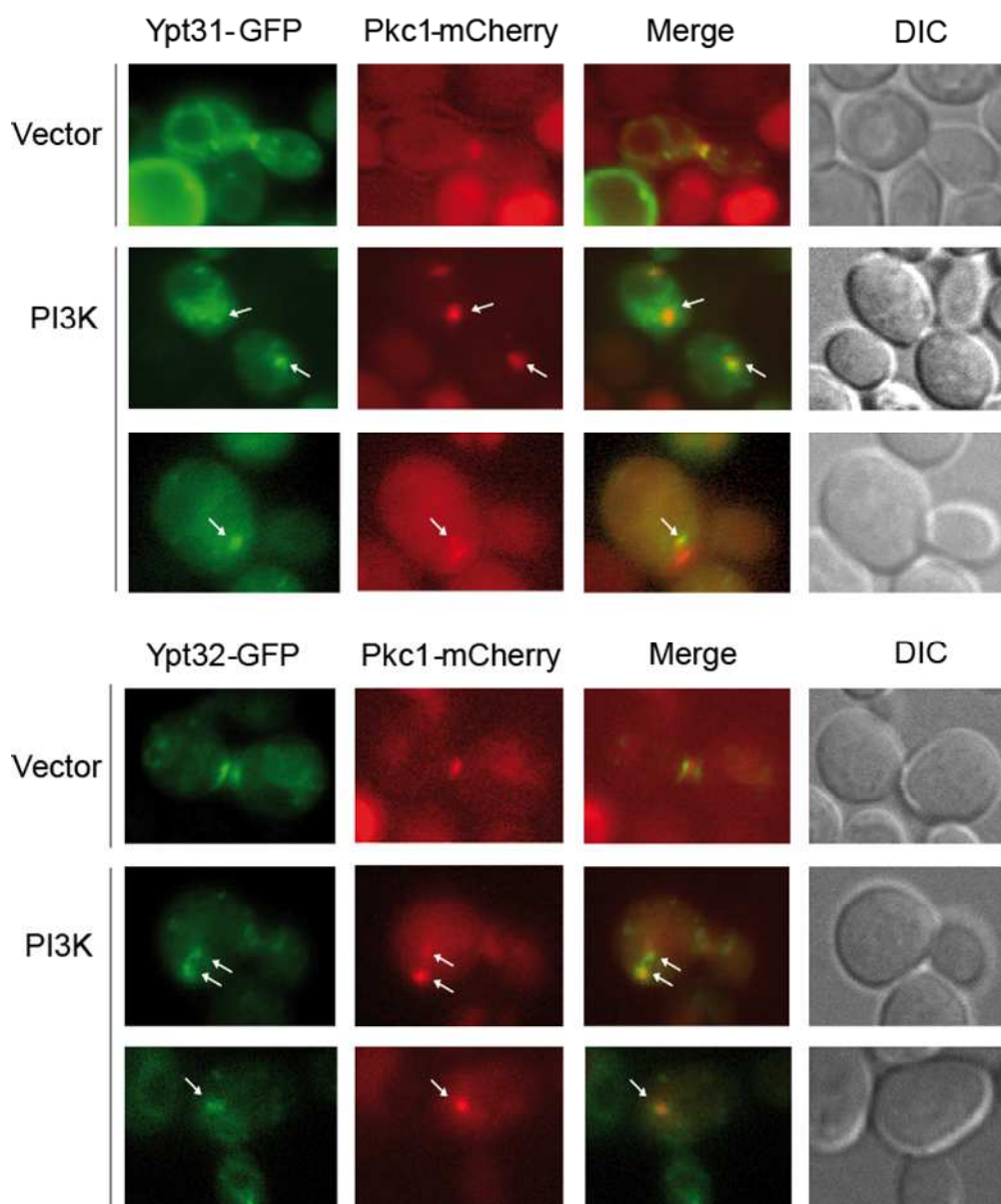


Fig. 44. Co-localización de las Rab GTPasas Ypt31/32 con Pkc1 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) y DIC (4ª columna). Células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con los plásmidos pRC647 (GFP-Ypt31) o pRC630 (GFP-Ypt32) y con PVD67-Pkc1-mCherry, con el vector vacío YCpLac22 o el plásmido YCpLac22-GAL1-PI3K α -CAAX (PI3K).

Como se aprecia en las células control, estas proteínas mostraron una localización polarizada en el septo de separación entre la célula madre y la célula hija, coincidente también con Pkc1, además de presentarse en vesículas intracelulares (Figura 44). Cuando se examinó la localización en células expresando p110 α -CAAX, un 72 \pm 3% y 71 \pm 6% de las células (N=130) que presentaban puntos de Pkc1 manifestaron co-

localización de esta proteína con compartimentos marcados tanto con Ypt31 como con Ypt32. Estos resultados sugieren que los compartimentos en que se localiza Pkc1 son probablemente endosomas implicados en procesos de reciclaje hacia la membrana plasmática.

3.8.6. Los puntos en los que se localiza Pkc1 co-localizan con la vSNARE Snc1

Trabajos previos habían demostrado que la vSNARE Snc1 se recicla en la célula desde endosomas tempranos a través del aparato de Golgi mediante las Rab GTPasas Ypt31/32 y su efector Rcy1 (Chen *et al.*, 2005). Dado que Pkc1 co-localizaba con las Rab GTPasas Ypt31/32, era posible que estuviera siguiendo el mismo recorrido que otros cargos reciclados, como la proteína Snc1. El estudio de esta proteína en las células control mostró que Snc1 se localiza en compartimentos citoplásmicos así como en zonas de crecimiento polarizado (Apartado 3.3, Figura 27), y que únicamente en esta última localización coincidía con Pkc1 (Figura 45).

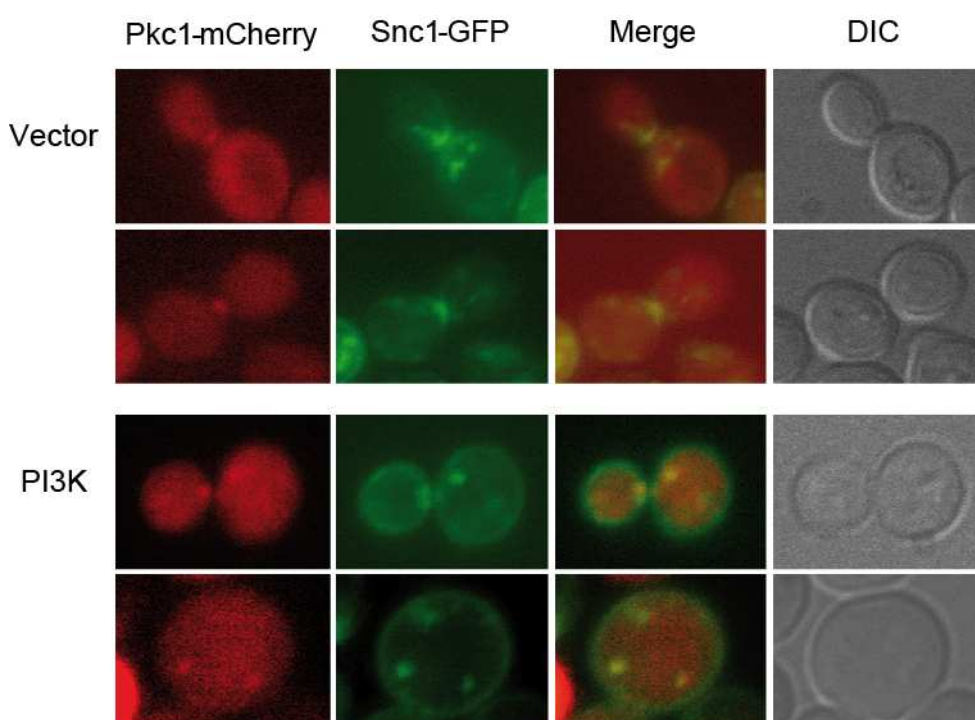


Fig. 45. Co-localización de la vSNARE Snc1 con Pkc1 en células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) y DIC (4ª columna). Células de la cepa silvestre YPH499 co-transformadas con los plásmidos pRS315-HA-GFP-cSNC1 y con PVD67-Pkc1-mCherry, con el vector vacío YCpLac22 o el plásmido YCpLac22-GAL1-PI3Kα-CAAX (PI3K).

En células que expresaban PI3K, observamos que existía una co-localización entre ambas proteínas también en los compartimentos citoplasmáticos en un $75 \pm 8\%$ de las células (N=80) que mostraban esta localización de Pkc1. Este resultado refuerza la hipótesis de que, en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P_2 , Pkc1 se acumula en endosomas involucrados en el reciclaje a la membrana plasmática por medio de las GTPasas Ypt31/32.

3.8.7. La localización de Pkc1 en condiciones de expresión de PI3K coincide con la de otros componentes de la ruta CWI

En vista de estos resultados nos planteamos si el resto de componentes de la ruta CWI que presentaban el mismo patrón polarizado que Pkc1, se localizaban también en estos endosomas de reciclaje. La GTPasa Rho1 se concentra en sitios de crecimiento polarizado donde activa a Pkc1 (Yamochi *et al.*, 1994; Qadota *et al.*, 1996), por lo que resultaba particularmente interesante el estudio de la localización de esta proteína.

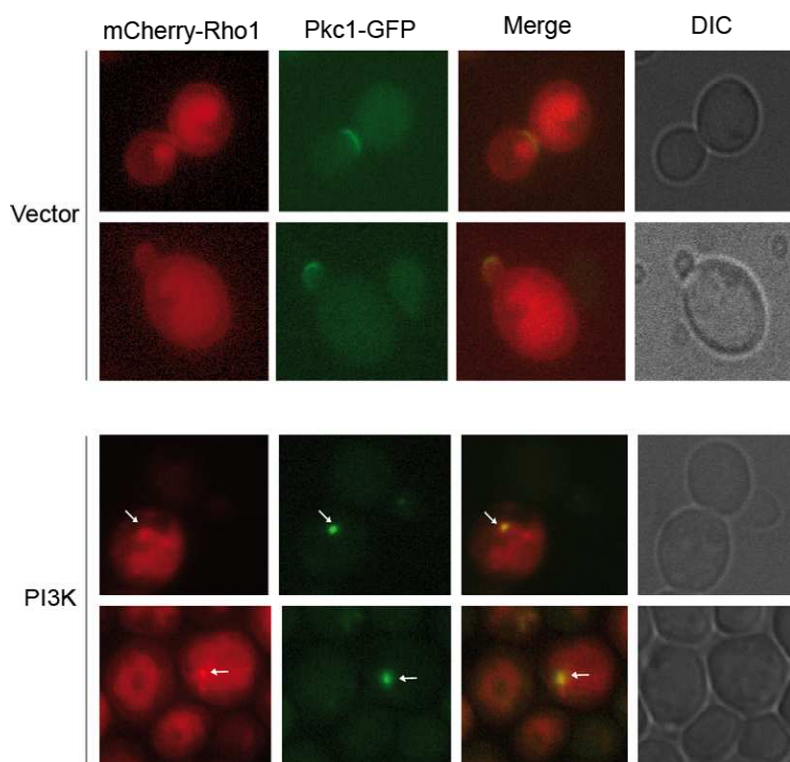


Fig. 46. Co-localización de la GTPasa Rho1 con Pkc1 en células expresando p110 α -CAAX mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) y DIC (4ª columna). Células de la cepa MML550 (Pkc1-GFP) co-transformadas con el plásmido YCpLac111-mCherry-Rho1 y con el vector vacío YCpLac22 (vector) o el plásmido YCplac22-GAL1-PI3K α -CAAX (PI3K).

Como se puede ver en la Figura 46, en células control expresando un vector vacío, Rho1 además de concentrarse en los sitios de crecimiento polarizado donde coincide con Pkc1, se distribuye uniformemente por toda la membrana plasmática y la vacuola. En células expresando p110 α -CAAX, Rho1 perdió esta localización y se acumuló en membranas internas quedando además retenida en unos puntos que co-localizaron con Pkc1. El 76 \pm 4% de las células (N=300) expresando p110 α -CAAX que contenían puntos marcados con Pkc1 presentaron co-localización de Rho1 en dichos puntos.

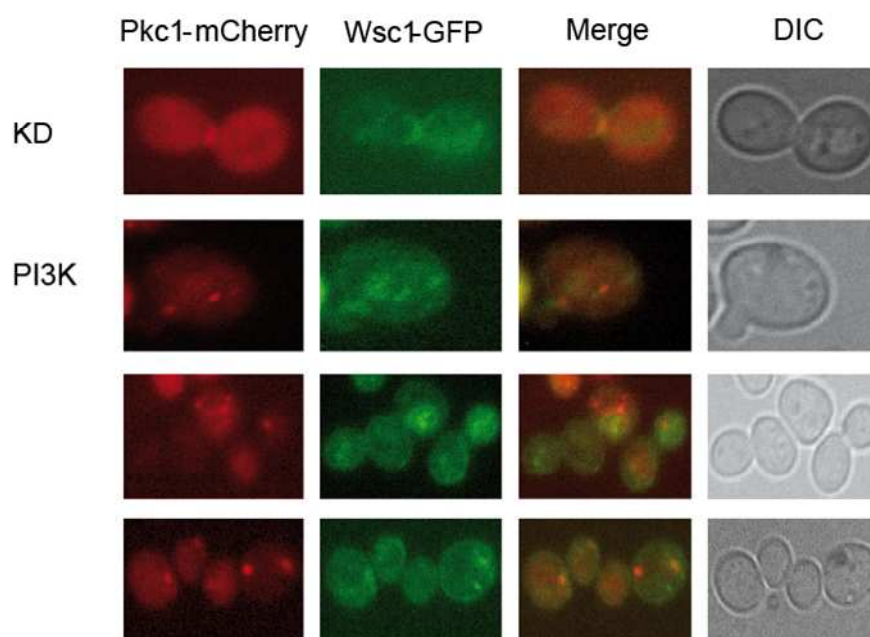


Fig. 47. Co-localización del receptor de la ruta CWI Wcs1 con Pkc1 células expresando PI3K mediante microscopía de fluorescencia (1ª, 2ª y 3ª columna) y DIC (4ª columna). Células de la cepa silvestre HSK13-2A (Wsc1-GFP) co-expresando los plásmidos YcPLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YcPLG-PI3K α -CAAX (PI3K) y PVD67-Pkc1-mCherry.

El receptor Wsc1, que como se vio en el apartado 3.7.4 es el receptor implicado en la transducción de señales a través de la ruta CWI cuando se expresa p110 α -CAAX, se localiza en condiciones normales de forma polarizada en la parte apical de las yemas emergentes y en el septo de separación de la célula madre y la célula hija (Delley *et al.*, 1999). De acuerdo con esto, cuando se visualizó la localización del receptor Wcs1 y de Pkc1 en las células control que expresan la forma inactiva de PI3K, ambas proteínas manifestaron una localización polarizada (Figura 47). Sin embargo, en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂ por la expresión de PI3K activa, Wsc1 perdió, al igual que Pkc1 y que Rho1, su polarización y se localizó en mayor medida en la membrana plasmática

de la célula y además en membranas internas. Además, el $69\pm 14\%$ de las células (N=110) que contenían puntos citoplásmicos marcados con Pkc1 en estas condiciones, presentaron co-localización con el marcaje de Wsc1 en dichos puntos.

Por tanto, en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂ inducidas por la expresión de p110 α -CAAX, Rho1 y Wsc1 presentan una localización coincidente con Pkc1 en compartimentos que han sido caracterizados como endosomas de reciclaje.

3.9. El tratamiento con el inhibidor 15e de PI3K revierte los efectos causados por la expresión de PI3K en levadura

En el primer bloque de resultados se describió cómo el tratamiento con inhibidores de PI3K rescata el crecimiento de levaduras expresando esta proteína, debido al bloqueo específico de su actividad catalítica. Siguiendo este razonamiento, el tratamiento con un inhibidor de PI3K debería revertir los efectos ocasionados por la expresión de esta proteína en levadura, tales como la activación de la ruta CWI o la alteración de la localización de Pkc1.

3.9.1. El tratamiento con 15e disminuye la fosforilación de Slt2 inducida por PI3K

Con este objeto de conocer si la ruta CWI se estimulaba en condiciones en que la actividad de PI3K estaba bloqueada, se trataron las células con el compuesto 15e que, como se vio en el bloque I de resultados, fue el inhibidor de PI3K que produjo una inhibición más efectiva en una cepa silvestre de todos los que fueron ensayados. Las células que habían estado expresando PI3K se trataron con dosis crecientes del inhibidor 15e (30, 60 y 90 μ M). Como se había visto previamente, en este rango de concentraciones el rescate de crecimiento causado por inhibición de PI3K se producía de forma directamente proporcional a la dosis de compuesto aplicada, y por tanto, al grado de inhibición de PI3K. En estas condiciones, la fosforilación de Slt2 se redujo notablemente y de una forma dosis dependiente en comparación con la de células que no habían sido tratadas con el compuesto (Figura 48A). Esto indica que el efecto de PI3K sobre la activación de la ruta CWI es reversible ya que puede reducirse mediante el tratamiento con un inhibidor específico de esta proteína.

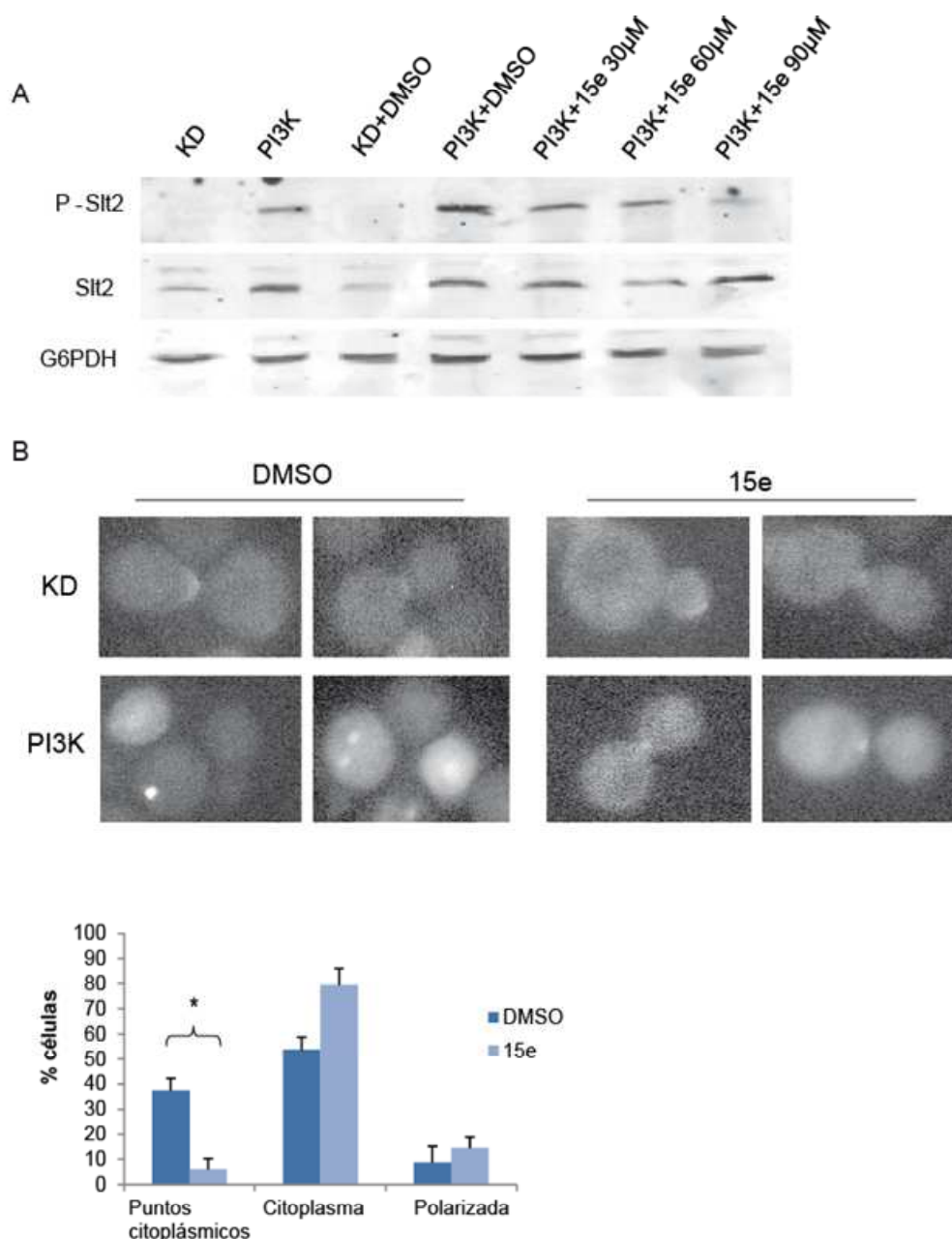


Fig. 48. Efecto del tratamiento con el inhibidor de PI3K 15e sobre células expresando esta proteína. (A) *Western-blotting* de extractos de células de la cepa silvestre BY4741 que han expresado los plásmidos YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-PI3Kα-CAAX (PI3K) en medio SG durante 4 horas (primer y segundo carril), que han sido tratadas adicionalmente con DMSO como control (tercer y cuarto carril) o con 15e a las dosis de 30, 60 y 90 μM (quinto, sexto y séptimo carril, respectivamente) durante 90 minutos. La inmunodetección se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-phospho-p42/44, anti-Slt2 y anti-G6PDH, como control de carga. (B) Localización de Pkc1 en células de la cepa silvestre YPH499 co-expresando los plásmidos YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-PI3Kα-CAAX (PI3K) y PVD67-Pkc1-mCherry cultivadas en medio SG, tratadas con 90 μM de 15e o con DMSO como control durante 5 h. La gráfica muestra el porcentaje de células expresando p110α-CAAX que presentan señal de Pkc1 en puntos citoplásmicos, en el citoplasma de la célula o en sitios de polaridad.

3.9.2. El tratamiento con 15e reduce la aparición de compartimentos citoplásmicos de Pkc1

Para saber si el tratamiento con el inhibidor 15e también afectaba a la localización de Pkc1 en puntos citoplásmicos, se trató a las células expresando PI3K con la mayor de las dosis empleadas para el estudio de la fosforilación de Slt2. Dichas células presentaron una reducción significativa en el número de puntos citoplásmicos marcados con Pkc1 (Figura 48B). Los resultados de los experimentos realizados con el compuesto 15e sobre los efectos celulares que ocasiona la expresión heteróloga de PI3K se corresponden con los obtenidos en los ensayos de inhibición de PI3K y suponen otra evidencia más de que todos los fenotipos que se aprecian en las células de levadura cuando se expresa PI3K se deben a su actividad catalítica.

3.10. Rastreo genómico de procesos regulados por PtdIns-4,5P₂ en la célula de levadura.

A pesar del papel esencial del PtdIns-4,5P₂ en la célula, resulta difícil explorar las funciones que este segundo mensajero lipídico desempeña dado que la quinasa que lo sintetiza, Mss4, es esencial, lo cual impide explotar las herramientas post-genómicas disponibles en el modelo de levadura. El uso de alelos condicionales de esta quinasa sensibles a temperaturas restrictivas ha aportado importantes contribuciones al conocimiento de las funciones que este segundo mensajero desempeña en levadura; sin embargo las conclusiones que se obtienen de estos experimentos se ven limitadas por los importantes cambios que la membrana plasmática sufre a altas temperaturas de incubación. La eliminación de PtdIns-4,5P₂ mediante la expresión heteróloga de PI3K supone una interesante aproximación alternativa para abordar este problema.

La colección de mutantes carentes de genes no esenciales de levadura [(*collection from European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis* (EUROSCARF))] se ha empleado para un amplio número de rastreos con muy distintos fines. Una de las posibles aplicaciones de esta colección es la identificación de genes cuya ausencia implica la supresión o la potenciación de un fenotipo en particular. En este caso sería la inhibición de crecimiento causada por la falta de PtdIns-4,5P₂ inducida por expresión de PI3K; de esta manera se podrían establecer nuevos efectores celulares o procesos que pudiesen estar regulados por este fosfoinosítido. Para realizar el rastreo de dicha

colección, se escogió una versión miristoilada de p110 α (apartado 2.2) que causa una inhibición de crecimiento parcial y, por tanto, permite detectar tanto las interacciones genéticas positivas de supresión del fenotipo inhibitorio sobre el crecimiento como las negativas de agravamiento del fenotipo.

La transformación de la colección, constituida por 4847 cepas haploides mutantes, se efectuó con una eficiencia del 89%; de forma global se identificaron visualmente 103 interacciones genéticas positivas de supresión y 196 negativas de agravamiento de fenotipo (Figura 50). Las interacciones positivas se detectaron en placas multipocillo en medio líquido. Sin embargo no pudieron identificarse en medio sólido en ensayos en gota, porque la réplica directa implica un exceso de inóculo que impide la apreciación de un posible efecto de supresión. Por el contrario, las interacciones negativas pudieron apreciarse tanto en medio líquido como en medio sólido (Figura 49).

Tras verificar por duplicado estos resultados en placa multipocillo, la supresión o agravamiento de la inhibición de crecimiento causada por PI3K se reprodujo en 34 de los 103 y 29 de los 196 mutantes, respectivamente. La alta proporción de falsos positivos en el rastreo primario en el caso de mutaciones que agravan el efecto se debe a que muchos mutantes presentan problemas para crecer en galactosa.

La confirmación de estos resultados se realizó mediante diluciones seriadas decimales de manera individual. Dado que la inhibición de crecimiento ejercida por la versión miristoilada de p110 α es parcial, todos los supresores de fenotipo que fueron seleccionados inicialmente se co-transformaron con los plásmidos YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX, como control negativo, o YCpLG-Myr-PI3K α Q y con pYES2-GFP-Akt1, cuya expresión en la cepa silvestre origina una toxicidad mayor y, por tanto, facilita la detección visual de un efecto supresor sobre la inhibición de crecimiento (Figura 50). Los potenciadores de fenotipo fueron transformados solamente con la versión miristoilada de p110 α , ya que un incremento en la toxicidad que ejerce esta proteína es fácilmente detectable (Figura 51). Mediante esta confirmación 28 cepas mutantes fueron capaces de suprimir la inhibición de crecimiento causada por p110 α y 22 fueron capaces de agravarla, lo que supone un 0,6% y un 0,5% respectivamente de las cepas mutantes rastreadas (Figura 49). Para corroborar que el efecto supresor de fenotipo no se debía a un descenso en la expresión de p110 α se analizó mediante *Western-blotting* la

expresión de esta proteína con anticuerpos específicos frente a p110 α (datos no mostrados); todos los candidatos presentaron una expresión adecuada de p110 α a excepción de *hsc82 Δ* y *ram1 Δ* . Los genes cuya falta produjo la supresión o el agravamiento de fenotipo quedan recogidos en las Tablas 10 y 11 y se encuentran agrupados en categorías funcionales según las anotaciones de ontología génica en bases de datos. Entre los mutantes supresores de fenotipo de PI3K, se apreció un enriquecimiento funcional estadísticamente significativo según la herramienta bioinformática *Genecodis* en aquellos que carecían de genes relacionados con el procesamiento del mRNA (Tabla 10). En los mutantes potenciadores de fenotipo se encontraron significativamente representados aquellos que carecían de genes relacionados con la traducción de proteínas y con el aparato de Golgi (Tabla 11).

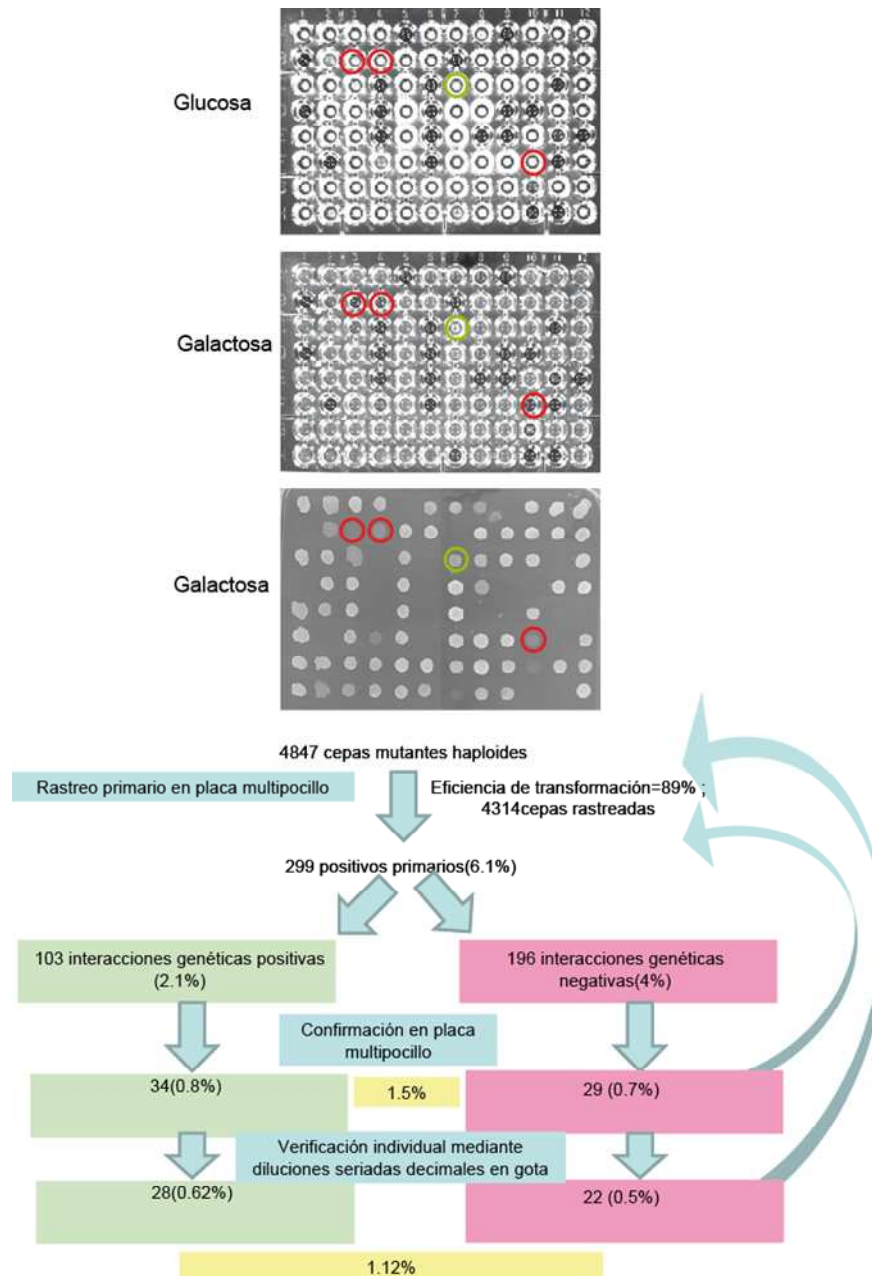
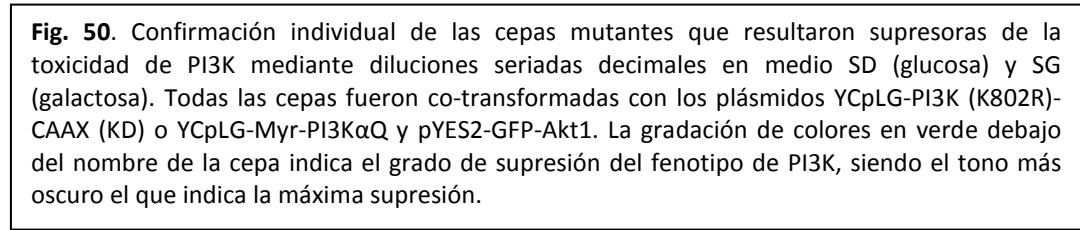


Fig. 49. Rastreo de la colección de mutantes haploides delecionados en genes no esenciales de *S. cerevisiae* para la búsqueda de moduladores de la toxicidad de PI3K en este organismo. (A) Ejemplo de placas representativas del rastreo. Las cepas mutantes carentes de cada uno de los genes eran transformadas con el plásmido YCpLG-Myr-PI3K α Q e incubadas en medio SD (glucosa). Los pocillos cubiertos por un círculo azul no contienen levaduras en las placas originales de la colección y los cubiertos por un círculo amarillo no se transformaron con el plásmido. Posteriormente se sembraban en medio SG (galactosa) tanto líquido como sólido, y se seleccionaban aquellos que crecían más o menos que el resto de las cepas mutantes de la misma placa expresando PI3K (señalados en verde y rojo, respectivamente). (B) Diagrama que muestra las sucesivas etapas seguidas en el rastreo y los porcentajes de cepas mutantes que resultaron positivas en cada una de ellas; en verde se señalan los valores obtenidos para los supresores de fenotipo, en rojo para los potenciadores y en amarillo el porcentaje global correspondiente a la suma de ambos.



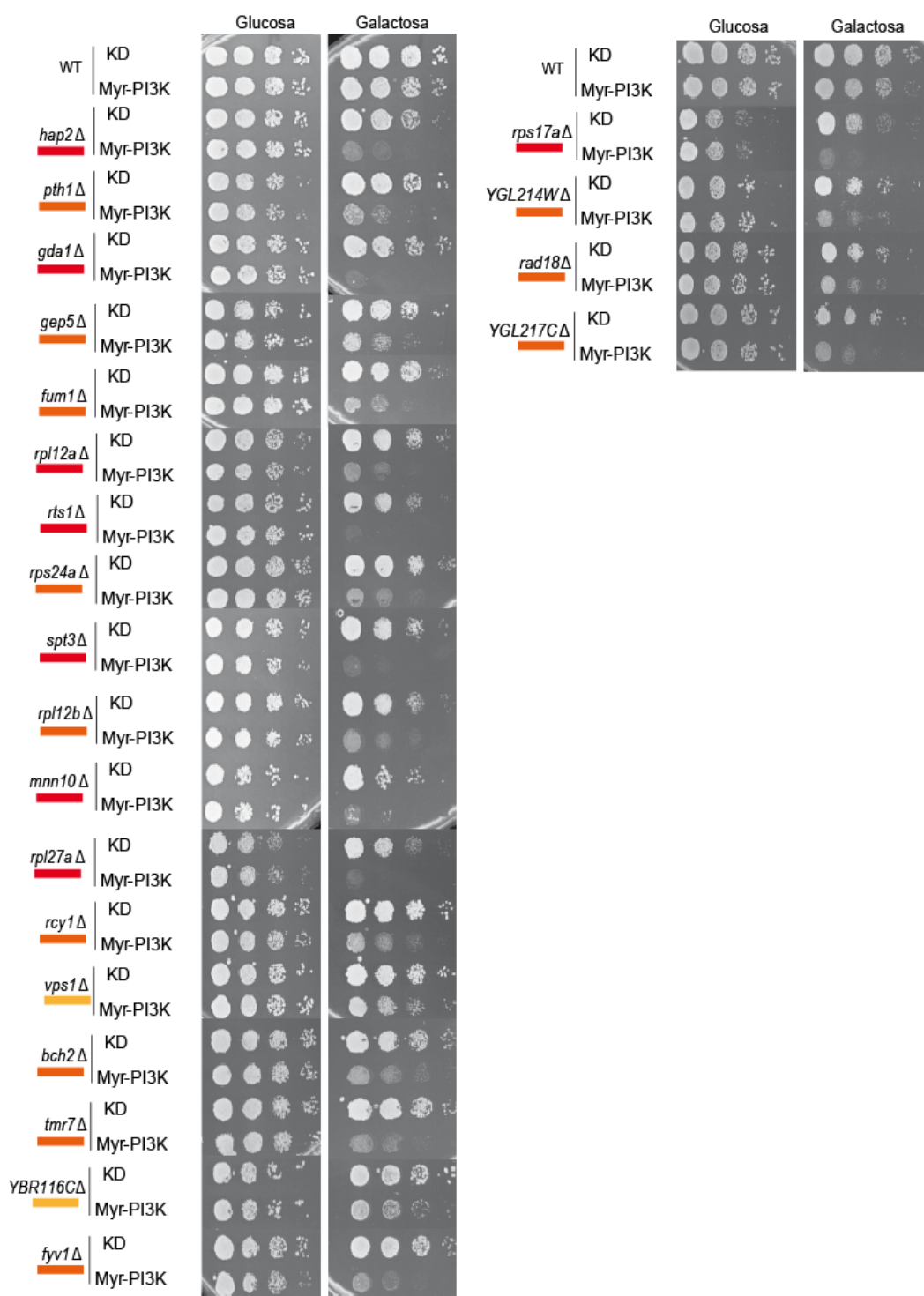


Fig. 51. Confirmación individual de las cepas mutantes que resultaron potenciadoras de la toxicidad de PI3K mediante diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa). Todas las cepas fueron transformadas con los plásmidos YCpLG-PI3K (K802R)-CAAX (KD) o YCpLG-Myr-PI3KαQ. La gradación de colores debajo del nombre de la cepa indica el grado de agravamiento del fenotipo de PI3K siendo el color rojo el que indica el mayor grado de agravamiento de fenotipo, en naranja un grado intermedio y en mostaza un grado leve.

Tabla 9. Genes cuya delección suprime el fenotipo de PI3K, agrupados según las anotaciones de ontología génica proporcionadas por la base de datos SGD. Cuando la asociación fue estadísticamente significativa se indica entre paréntesis el *p-value* y la categoría para la que se obtuvo dicha asociación según la herramienta bioinformática *Genecodis*.

Grupo	ORF	Nombre del gen	Descripción
Procesamiento del mRNA (Proceso biológico, p=0,05)	YGR129W	SYF2	Miembro del complejo NTC que posiblemente participa en el procesamiento del pre-mRNA
	YNL187W	SWT21	Interacciona genéticamente con Tgs1. Participa en <i>splicing</i> del mRNA.
	YGR064W		El ORF YGR064W coincide parcialmente con el ORF YGR063C, que codifica el gen SPT4, que regula la transcripción y el procesamiento del RNA.
	YPL157W	TGS1	Trimetil guanosín sintasa, que participa en la captura de RNAs.
	YPR057W	BRR1	Participa en el procesamiento del pre-mRNA.
Señalización	YOR008C	WSC1	Receptor de la ruta CWI.
	YLR371W	ROM2	GEF de Rho1. Participa en la transmisión de la señal a través de CWI.
	YNL138W	SRV2	Proteína asociada a la adenilato ciclasa (CAP) que favorece el recambio de monómeros de actina.
	YNL056W	OCA2	Fosfatasa de especificidad dual (DSP) implicada en respuesta a estrés por cafeína y rapamicina
	YHL029C	OCA5	Proteína de función desconocida con homología a Rab GAPs
	YDR067C	OCA6	Fosfatasa de especificidad dual (DSP) implicada en respuesta a estrés por cafeína y rapamicina
Ribosoma mitocondrial	YPL183W-A	RTC6	Posible proteína del ribosoma de la mitocondria.
	YDR462W	MRPL28	Proteína del ribosoma de la mitocondria.
Ribosoma	YOR369C	RPS12	Componente de la subunidad 40S del ribosoma.
	YMR014W	BUD22	Proteína con un posible papel en la selección del sitio de polaridad. Participa en la biogénesis del ribosoma.
Transportadores de membrana	YLR138W	NHA1	Antiportador que regula el transporte de Na ⁺ /H ⁺
	YLL028W	TPO1	Transportador de poliaminas que reconoce espermina, putrescina y espermidina.
	YIL134W	FLX1	Participa en el transporte de FAD en la membrana mitocondrial.
	YLR047C	FRE8	Similar a la férrico reductasa transmembranal, que puede estar implicada en el transporte de

			electrones en la membrana plasmática.
Otros	<i>YLL030C</i>	<i>RRT7</i>	La delección del ORF <i>YLL030C</i> coincide parcialmente con la región promotora del ORF <i>YLL031C</i> , lo que indica que probablemente se haya producido la delección de esta zona. <i>YLL030C</i> codifica el gen <i>GPI13</i> , una fosforiltransferasa localizada en la membrana del ER que añade residuos de fosfatidiletanolamina a la manosa del glicofosfatidilinositol (GPI).
	<i>YOR265W</i>	<i>RBL2</i>	Implicada en morfogénesis de microtúbulos.
	<i>YIL049W</i>	<i>DFG10</i>	Posible poliprenol reductasa
	<i>YMR035W</i>	<i>IMP2</i>	Subunidad catalítica del complejo peptidasa de la membrana interna mitocondrial.
	<i>YJR055W</i>	<i>HIT1</i>	Proteína necesaria para el crecimiento a elevadas temperaturas
	<i>YMR186W</i>	<i>HSC82</i>	Chaperona citoplásmica de la familia Hsp90, se induce en condiciones de estrés térmico y facilita la activación de la MAPK de la ruta CWI Slt2
	<i>YDL090C</i>	<i>RAM1</i>	Subunidad beta de la CAAX farnesil transferasa.
Desconocidas	<i>YDL073W</i>		Proteína de función desconocida.
	<i>YJR056C</i>		Proteína de función desconocida. Interacciona con Boi2 y con Bcp1.

Tabla 10. Genes cuya delección potencia el fenotipo de PI3K, agrupados según las anotaciones de ontología génica proporcionadas por la base de datos SGD. Cuando la asociación fue estadísticamente significativa se indica entre paréntesis el *p-value* y la categoría para la que se obtuvo dicha asociación según la herramienta bioinformática *Genecodis*.

Grupo	ORF	Nombre del gen	Descripción
Traducción proteica (Proceso biológico, $p=3,2 \cdot 10^{-6}$)	YEL054C	RPL12A	Proteína de la subunidad 60S del ribosoma.
	YER074W	RPS24A	Proteína de la subunidad 40S del ribosoma.
	YDR418W	RPL12B	Proteína de la subunidad 60S del ribosoma.
	YHR010W	RPL27A	Proteína de la subunidad 60S del ribosoma.
	YBR061C	TRM7	2'-O-ribosa metil-transferasa
	YDR024W	FYV1	La delección del ORF YDR024W coincide parcialmente con la región promotora del ORF YDR025W, lo que indica que probablemente se haya producido la delección de esta zona. El ORF YDR025W es el gen RPS11A, que codifica para una proteína de la subunidad 40S.
	YML024W	RPS17A	Proteína de la subunidad 40S del ribosoma.
Aparato de Golgi (Componente celular, $p=0,04$)	YEL042W	GDA1	Guanosín-difosfatasa localizada en el aparato de Golgi implicada en el transporte de GDP-manosa en el lumen de este orgánulo.
	YDR245W	MNN10	Subunidad del complejo manosiltransferasa del aparato de Golgi
	YJL204C	RCY1	Proteína <i>F-box</i> relacionada con el reciclaje de proteínas internalizadas mediante endocitosis. Efectora de las Rab GTPasas Ypt31/32 y localizada en sitios de crecimiento polarizado.
	YKR027W	BCH2	Miembro de la familia de proteínas ChAPs; forma el complejo exómero junto Chs5p, para regular el transporte de cargos desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática.
Metabolismo	YBR116C		El ORF YBR116C coincide parcialmente con el ORF YBR117C, que codifica el gen <i>TKL2</i> , transketolasa 2, la cual participa en la vía de las pentosas fosfato
	YGL237C	HAP2	Subunidad del complejo Hap2p/3p/4p/5p, activado por el grupo hemo y reprimido por glucosa.
	YPL262W	FUM1	Fumarasa, convierte fumárico a ácido málico.
RNA y regulación de la transcripción	YHR189W	PTH1	Peptidil tRNA hidrolasa localizada en la mitocondria.
	YDR392W	SPT3	Subunidad del complejo regulatorio de la transcripción SAGA.
	YGL214W		El ORF YGL214W coincide parcialmente con el ORF YGL213C, que codifica el gen <i>SKI8</i> , un componente

			del complejo Ski que media degradación del RNA por el exosoma.
Otros	<i>YLR091W</i>	<i>GEP5</i>	Proteína mitocondrial requerida para la síntesis de fosfatidil etanolamina; posible papel en fosforilación oxidativa. Interacciona genéticamente con prohibitina 1.
	<i>YOR014W</i>	<i>RTS1</i>	Subunidad regulatoria de la proteína fosfatasa 2A (PP2A)
	<i>YKR001C</i>	<i>VPS1</i>	Proteína con similitud a dinamina
	<i>YCR066W</i>	<i>RAD18</i>	E3 ubiquitín ligasa, forma un heterodímero con Rad6p para monoubiquitinar a la proteína PCNA-K164.
	<i>YGL217C</i>		El ORF <i>YGL217C</i> coincide parcialmente con el ORF <i>YGL216W</i> , que codifica el gen KIP3, quinesina que participa en el posicionamiento del huso mitótico.

DISCUSIÓN

Detección de extractos de origen microbiano con actividad inhibidora sobre PI3K en un bioensayo en levadura

La subunidad catalítica de PI3K, p110 α , es una diana terapéutica de gran relevancia por su importante papel en la aparición y el desarrollo de tumores en humanos, entre otras patologías. Durante los últimos años se ha producido un gran avance en el descubrimiento de nuevas moléculas activas que bloquean la ruta de señalización en la que participa esta proteína a distintos niveles, muchas de las cuales están mostrando resultados prometedores en ensayos clínicos. Sin embargo, la necesidad de optimización de la terapia hace que la búsqueda de nuevas moléculas con actividad sobre esta ruta sea aún de gran importancia. En este trabajo se ha puesto de manifiesto la validez de un sistema de levadura humanizada, mediante la expresión heteróloga de p110 α , como herramienta de gran utilidad en la investigación aplicada a la caracterización de esta diana y a la identificación de compuestos con potencial actividad antitumoral.

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo modelo válido para la identificación de moléculas con actividad biológica, bien sobre una diana que se encuentre conservada en organismos eucariotas superiores o que se haya expresado de manera heteróloga, en el caso de las levaduras humanizadas. De hecho se han desarrollado numerosos bioensayos en levadura con los que se han llevado a cabo importantes hallazgos de compuestos activos. Entre otros muchos ejemplos, cabe citar el trabajo reciente de Resende *et al.* (2013) en el que descubrieron el efecto estrogénico de diversos flavonoides; el de Nakaya *et al.* (2012), que pusieron de manifiesto el efecto antienvjecimiento del compuesto natural beauveriólido I; el de Lopez *et al.* (2012), que aislaron varias moléculas que evitan la agregación del péptido β -amiloide; o el de Tardiff *et al.* (2013) en el que hallaron un compuesto que anulaba la toxicidad ejercida por la α -sinucleína.

Existen trabajos de otros grupos que también han empleado nuestro sistema de levadura humanizada con PI3K con diversas aplicaciones. Zunder *et al.* (2008) lo utilizaron para la evaluación del comportamiento de versiones mutantes de p110 α con potencial resistencia o sensibilidad a una batería de compuestos inhibidores de la actividad de esta proteína. Couplan *et al.* (2009) pusieron de manifiesto la actividad inhibidora de los ácidos grasos poliinsaturados sobre p110 α ; Saijo *et al.* (2012) llevaron a

cabo un rastreo con una colección de compuestos químicos en el que descubrieron una actividad inhibidora sobre p110 α en un compuesto con utilidad clínica en el tratamiento de linfomas, por ser adicionalmente un inhibidor de las desacetilasas de histonas.

Uno de los objetivos de este trabajo era optimizar el bioensayo de PI3K en levadura para la realización de rastreos *in vivo* para identificar compuestos inhibidores. La puesta a punto ha implicado varias etapas en las que se han mejorado diversos aspectos, tales como la selección de la versión más adecuada de p110 α sobre la que llevar a cabo el bioensayo, la modalidad sobre la que realizarlo y el desarrollo de estrategias para incrementar la permeabilidad al paso de compuestos o para aumentar su concentración intracelular en *S. cerevisiae*. Hemos determinado que resulta ventajoso escoger una versión de p110 α que cause una drástica inhibición del crecimiento de la levadura, en lugar de aquellas que causan un efecto inhibitorio parcial, con objeto de facilitar la detección del efecto de rescate que ejercen los inhibidores. Para la apreciación de un efecto inhibidor sobre el efecto de Akt en levadura, el cual puede ser indirecto a través del bloqueo de p110 α silvestre o directo a través de la inhibición de Akt, ha sido necesario recurrir al mutante *vip1 Δ* (Rodríguez-Escudero *et al.*, resultados no publicados), el cual carece de una quinasa no esencial implicada en la síntesis de inositol fosfatos, en el que se incrementa la toxicidad causada por Akt. No obstante, la aplicación de este sistema para la detección de compuestos inhibidores podría llevarnos a seleccionar erróneamente compuestos que compensasen de alguna manera el efecto de la mutación *vip1 Δ* .

La adaptación del bioensayo de PI3K para su desarrollo sistemático a gran escala ha demostrado que es más apropiado realizarlo en medio líquido que en medio sólido, ya que el primero se puede llevar a cabo en placas multipocillo, permitiendo abarcar un amplio rango de concentraciones de los compuestos a ensayar y determinar cuantitativamente, a través de la medida indirecta del crecimiento por espectrofotometría, qué concentraciones de inhibidor resultan tóxicas y cuáles efectivas para el rescate. Además requiere cantidades muy inferiores de compuesto a las que se emplean en el ensayo de halo reverso en medio sólido.

La presencia de una serie de bombas de eflujo en la membrana plasmática que expulsan los compuestos del medio intracelular dificulta la realización de ensayos farmacológicos

en la levadura, motivo por el cual se ha generalizado en este campo el empleo de cepas delecionadas en genes que codifican una o varias de estas bombas (Arnoldo *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010). En nuestro caso, la realización de los ensayos en el mutante *snq2Δ* y la presencia de bajas concentraciones del detergente SDS (0,003%) han favorecido el incremento de concentraciones intracelulares de los compuestos evaluados, potenciando notablemente la recuperación de crecimiento obtenida con inhibidores conocidos de PI3K. El incremento en la sensibilidad del sistema que hemos encontrado a través de la combinación de ambas estrategias, especialmente con los compuestos LY294002, 15e y PI-103, ha determinado que fueran estas las condiciones establecidas para la realización del bioensayo a gran escala.

La puesta a punto del bioensayo realizada con los inhibidores comerciales de PI3K nos ha permitido además establecer que las 1,4-morfolino-2-fenilquinazolininas, PI-103 y 15e (Hayakawa *et al.*, 2006a), han sido los inhibidores más potentes en nuestro sistema, superando al LY294002 tal como se había descrito previamente en líneas celulares y ensayos *in vitro* (Vlahos *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 2006; Marone *et al.*, 2008). Pese a que el ZSTK474 (Yaguchi *et al.*, 2006) y el GDC0941 (Folkes *et al.*, 2008) están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos, su actividad en este bioensayo ha sido inferior en comparación con los anteriormente citados, posiblemente porque la permeabilidad al paso de estos compuestos, de mayor peso molecular, se encuentra reducida en células de levadura. La recuperación de crecimiento obtenida con los inhibidores comerciales de Akt ha sido notablemente inferior a la alcanzada con los inhibidores de PI3K; esto puede deberse a que estos compuestos estén inhibiendo inespecíficamente también la actividad de otras AGC quinasas de la célula de levadura (Lindsley *et al.*, 2007) que desempeñan importantes funciones, como por ejemplo Pkc1, Tor2 o Ypk1/2, entre otras (Jacinto y Lorberg, 2008).

El bioensayo optimizado se ha empleado de forma sistemática para detección de extractos de origen microbiano con actividad inhibitoria sobre p110 α , en colaboración con la Fundación MEDINA. En una validación inicial a escala piloto ha presentado suficiente reproducibilidad y robustez, como lo han demostrado los parámetros estadísticos que miden la calidad de los rastreos a gran escala. Por otro lado, el porcentaje final de positivos obtenidos (0,6%) se encuentra dentro del rango de normalidad de acuerdo con los que se suelen obtener cuando se rastrean colecciones de

productos naturales en ensayos dirigidos sobre diana (Young *et al.*, 2006; Ruocco *et al.*, 2007; Parish *et al.*, 2009). Esto pone de manifiesto la validez del sistema para ser empleado en la búsqueda de compuestos con actividad frente a p110 α así como de los hallazgos realizados en este ensayo piloto.

En definitiva, consideramos que el bioensayo desarrollado en este trabajo presenta diversas ventajas respecto a otras opciones disponibles para la búsqueda y análisis de inhibidores de PI3K. Principalmente, es económico, rápido y sencillo en su manejo, ya que la detección de la inhibición de p110 α a través de la medida espectrofotométrica del crecimiento es fácilmente cuantificable, en comparación con la mayor complejidad que requieren tanto en su realización como en su interpretación los ensayos realizados en líneas celulares. Entre estos cabe mencionar el rastreo de tipo *High-content* basado en la redistribución de Akt-GFP a la membrana plasmática en líneas celulares tumorales (Wolff *et al.*, 2006), el cual requiere de complejos sistemas de análisis digital de imagen a gran escala para la medida e interpretación de los resultados. Nuestro sistema también resulta ventajoso en comparación con los ensayos *in vitro*, dado que solo requiere de un inóculo de levadura cultivada en un medio fácil de preparar y muy barato en placas de 96 pocillos en las que se disponen los extractos a rastrear. Los ensayos enzimáticos, por el contrario, enfrentan la diana purificada al compuesto inhibidor y están basados en la determinación del consumo de ATP bien a través de métodos radioactivos (Fuchikami *et al.*, 2002), luminométricos (Boldyreff *et al.*, 2008) o de desactivación de fluorescencia (Stankewicz y Rininsland, 2006). Para ello se emplean costosos reactivos, lo cual encarece el ensayo.

Dado que la detección de actividad está basada en la determinación del crecimiento, las moléculas son evaluadas en un contexto celular vivo, a diferencia de lo que ocurre en un ensayo *in vitro*. Además, aquellas que presentan toxicidad intrínseca para la célula eucariótica o son químicamente inestables no son seleccionadas, dado que no permiten la recuperación del crecimiento (Melese y Hieter, 2002). Puesto que el defecto en crecimiento de la levadura se debe de manera específica a la sobreexpresión de p110 α , este bioensayo permite detectar inhibidores directos y selectivos para esta diana, lo cual no es posible en otros tipos de ensayos, como por ejemplo los realizados sobre líneas tumorales en los que el efecto inhibidor sobre PI3K puede deberse a un antagonismo sobre cualquiera de los elementos de la ruta oncogénica (Link *et al.*, 2009). Esto implica

que nuestro sistema podría ser útil para precisar si la actividad de una determinada molécula candidata a bloquear esta ruta obtenida por cualquier otro sistema de rastreo, se debe a una acción directa sobre p110 α o no, aportando por tanto datos acerca de su mecanismo de acción.

Por otro lado, también presenta limitaciones. No podemos descartar que la aplicación de nuestro sistema para la búsqueda de inhibidores de PI3K seleccione algunos compuestos falsos positivos, como por ejemplo aquellos que incidan sobre el mecanismo de anclaje y localización de p110 α en la membrana plasmática. Aun así, esto sería improbable, porque el mecanismo de anclaje por prenilación C-terminal que se utiliza para esta proteína heteróloga es común al que opera en otras proteínas de levadura que se localizan en membranas celulares, como las pertenecientes a la superfamilia Ras de GTPasas pequeñas que ejercen funciones tan diversas como la proliferación celular, la secreción de proteínas o la respuesta al estrés. Estas funciones esenciales se verían también comprometidas por compuestos que afectaran a dicho mecanismo, lo que impediría que se apreciase un efecto de recuperación del crecimiento (Manandhar *et al.*, 2010). Podría ser posible también, que algunos de los compuestos seleccionados como positivos actuaran sobre los procesos que desencadena p110 α en levadura para llevar a cabo su toxicidad y no directamente sobre la actividad enzimática PI3K. Hemos puesto de manifiesto que existen determinados mutantes en los que el efecto inhibitorio de la versión Myr-p110 α se anula, por lo que cabe pensar que alguno de los compuestos aislados en nuestro sistema pudiese actuar bloqueando la actividad de proteínas de levadura relacionadas con la toxicidad que ejerce PI3K, mimetizando así el efecto de dichos mutantes. Sin embargo, dado que el efecto tóxico de p110 α -CAAX es muy drástico, sería difícil encontrar mutantes en los que éste se anulase y, por ello, es poco probable que se seleccionen este tipo de compuestos falsos positivos mediante el sistema de rastreo utilizado.

A diferencia de la mayoría de los rastreos realizados hasta el momento para la búsqueda de inhibidores de PI3K que se han basado principalmente en el uso de colecciones químicas, hemos recurrido a una colección de extractos de origen microbiano (actinomicetos y hongos), precisamente por tratarse de una fuente de diversidad química donde pueden hallarse nuevos compuestos y nuevas estructuras (Capon, 2012; Wolfender y Queiroz, 2012; Craney *et al.*, 2013). Los extractos microbianos ensayados

son mezclas complejas de compuestos químicos, por lo que es posible que el efecto sobre p110 α -CAAX se deba a la acción sinérgica o adyuvante de varias moléculas presentes en el extracto, que potencien o faciliten de alguna forma la inhibición de p110 α en levadura. El fraccionamiento de los extractos con actividad y su posterior evaluación en nuestro sistema, trabajo que estamos llevando a cabo en la actualidad en colaboración con la Fundación MEDINA, nos indicarán si el efecto se debe a un compuesto puro o a la combinación de varios. Asimismo se están realizando con dichos extractos y sus fracciones tanto ensayos de actividad enzimática *in vitro* sobre p110 α purificada como de proliferación en líneas celulares tumorales (N. de Pedro y F. Vicente, comunicación personal). Esto nos permitirá confirmar la especificidad de los extractos en la inhibición de esta proteína y verificar su posible actividad antitumoral en un contexto experimental más cercano al de su posible aplicación terapéutica, así como aislar la molécula responsable de la actividad inhibitoria.

En resumen, nuestro bioensayo supone una alternativa robusta, económica y sencilla para realizar un cribado primario a gran escala para la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria sobre p110 α y que carezcan de toxicidad intrínseca, de forma previa a su validación en otros sistemas más complejos o de mayor coste tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estudio funcional de los dominios C2 y RBD de PI3K (p110 α) en el sistema de levadura humanizada

Nuestro equipo de investigación ha explotado previamente este sistema de levadura humanizada para realizar tanto análisis estructurales y funcionales del supresor de tumores *PTEN*, como estudios de la penetrancia de mutaciones de *PTEN* halladas en clínica (Andres-Pons *et al.*, 2007; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2011b), dado que la expresión de esta proteína en su versión silvestre elimina la toxicidad causada por la actividad PI3K en la levadura.

Los resultados aportados por estos trabajos, junto con los aquí presentados, refuerzan la idea de que el sistema de expresión heteróloga de PI3K en levadura puede ser empleado tanto para llevar a cabo estudios farmacológicos como genéticos. Esto es posible porque este sistema es sensible a la actividad que presenta esta proteína en levadura. Ésta no solo puede evaluarse a través de la inhibición del crecimiento, sino que también se

corresponde con la fosforilación y reclutamiento a la membrana plasmática de su diana Akt y con la aparición de diversos fenotipos en levadura que hemos caracterizado en profundidad en este trabajo, como la activación de la ruta CWI y la presencia de la proteína quinasa Pkc1 en compartimentos citoplásmicos.

Es bien conocida la importancia que tiene la localización de PI3K en la membrana plasmática para la activación de las diferentes vías de señalización que regula en las células de mamífero. De hecho, la influencia reguladora sobre la actividad por parte tanto de la subunidad regulatoria p85 como de la GTPasa Ras están basadas en el reclutamiento de la subunidad catalítica a la membrana plasmática, que es donde está su sustrato. Hu *et al.* (1995) desarrollaron una versión constitutivamente activa de la subunidad catalítica p110 que mimetizaba la regulación positiva que ejerce la subunidad regulatoria p85 sobre ella y era capaz de desencadenar la señalización intracelular correspondiente en células de mamífero. Posteriormente este mismo grupo (Klippel *et al.*, 1996) desarrolló otras versiones constitutivamente activas mediante la introducción de señales de farnesilación C-terminal o de miristoilación N-terminal, que unen covalentemente proteínas a lípidos de membranas, y demostró que el reclutamiento a la membrana plasmática de p110 da lugar a la máxima actividad de la proteína y a la activación de la señalización intracelular de forma independiente de la estimulación por señales extracelulares. Como hemos visto en este trabajo, la localización de esta proteína en la membrana plasmática de la levadura es también esencial. Al igual que p110 α -CAAX, la introducción de una señal de N-miristoilación en p110 α (Myr-p110 α) causa un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura, aunque no tan agresivo en este caso. Esto ha resultado muy útil para la búsqueda de interacciones genéticas dado que nos ha permitido detectar genes de levadura en cuya ausencia se suprime o se agrava el fenotipo de inhibición del crecimiento. Sin embargo, en nuestro sistema, el efecto regulador positivo que lleva a cabo Ras sobre p110 α en las células de mamífero no se reproduce, lo que parece indicar que la actividad de esta proteína es independiente de su interacción con las homólogas en levadura Ras1 y Ras2. El hecho de que se haya descrito que la mutación K227E en p110 α , que anula la interacción con Ras en las células de mamífero, no es esencial para la actividad catalítica basal *in vitro* de la subunidad catalítica (Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2007), explicaría que el efecto sobre la levadura de esta versión mutante no se vea comprometido. Además, se ha demostrado que la ganancia de función que ejercen en líneas celulares las versiones

de p110 α que contienen extensiones aminoacídicas introducidas artificialmente en el extremo N-terminal requiere de la interacción con Ras (Sun *et al.*, 2011). Dado que en nuestro modelo la interacción con las proteínas Ras es prescindible para la actividad de p110 α , es lógico que dichas versiones no reproduzcan tampoco este efecto en levadura.

Además del control sobre la localización de la subunidad catalítica llevado a cabo por Ras y la subunidad regulatoria p85 en células de mamífero, p110 α cuenta con un dominio estructural C2. Estos dominios de forma general están implicados con la interacción con los fosfolípidos aniónicos de la membrana. Sin embargo, el dominio C2 de p110 α presenta un importante papel funcional, no solo en el reclutamiento de la proteína a la membrana plasmática, sino en la regulación del efecto inhibitorio que ejerce la subunidad regulatoria p85, encontrándose la interacción con dicha subunidad alterada en determinados tumores (Wu *et al.*, 2009). En nuestro sistema de levadura este dominio ha demostrado ser responsable en parte del efecto inhibitorio del crecimiento que ejerce la versión silvestre p110 α en co-expresión con Akt o el mutante oncogénico p110 α^{H1047R} , lo que demuestra que, en ausencia de otras señales que ejerzan la orientación de esta proteína hacia la membrana plasmática, este dominio participa en la interacción con esta estructura celular en la levadura. Por lo tanto, en este modelo, p110 α ejerce su actividad gracias a la proximidad a su sustrato en la membrana plasmática al igual que ocurre de forma natural en las células de mamífero. En ausencia de las diversas señales regulatorias presentes en eucariotas superiores, nuestro sistema permite un análisis directo de la interacción de p110 α con las membranas celulares. Además, nuestro equipo ha desarrollado versiones oncogénicas de la subunidad regulatoria p85 dirigidas a membrana mediante C-prenilación que, expresadas en levadura, son capaces de reclutar a la subunidad catalítica silvestre p110 α a la membrana plasmática, dando lugar a la inhibición del crecimiento (M. D. Oliver, T. Fernández-Acero, M. Molina, V. J. Cid y R. Pulido, datos no publicados). Esto indica que el sistema permite también el estudio de la interacción de p110 α con la subunidad regulatoria.

Repercusión de la eliminación de PtdIns-4,5P₂ en el tráfico vesicular

Este sistema no solo es válido para la realización de estudios genéticos y de bioensayos en busca de compuestos activos frente a p110 α , sino que además, debido a la actividad que las diferentes versiones de p110 α reproducen cuando se expresan en levadura, nuestro modelo supone una herramienta idónea para el estudio de la relevancia funcional del PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática. Su uso en este trabajo nos ha permitido reforzar las evidencias ya establecidas sobre la función que desempeña esta molécula en la célula de levadura, así como desvelar nuevas conexiones y regulaciones relacionadas con este fosfoinosítido.

Los efectos fenotípicos asociados a la expresión de p110 α -CAAX en la célula de levadura se correlacionan con una pérdida del PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). La importancia de esta molécula para la célula de levadura es conocida. Como se ha mencionado, las enzimas que participan en su síntesis, Stt4 y Mss4, son esenciales (Yoshida *et al.*, 1994a; Yoshida *et al.*, 1994b). La falta de PtdIns-4,5P₂ en nuestro sistema produce una pérdida de viabilidad celular, al igual que sucede cuando se inactivan dichas enzimas (Desrivieres *et al.*, 1998). En cualquier caso, no podemos descartar que la producción *in situ* de PtdIns-3,4,5P₃ pueda de alguna manera contribuir a los efectos descritos en este trabajo. Aunque este fosfoinosítido no parece existir de manera natural en la levadura, su presencia podría ser identificada de forma errónea por proteínas y complejos proteicos que reconocen otros fosfoinosítidos presentes en la célula, de forma que las funciones desempeñadas por éstos podrían verse alteradas.

En este trabajo hemos visto cómo en ausencia de PtdIns-4,5P₂ tiene lugar un defecto en la internalización endocítica en la célula de levadura, que causa la retención de la proteína Snc1 en la membrana plasmática. El bloqueo de la endocitosis no se produce de forma absoluta dado que el fluorocromo FM4-64 no queda retenido en la membrana plasmática, pero su acumulación en endosomas indica un defecto en el tráfico endocítico en estas condiciones. Muchos componentes de la maquinaria endocítica contienen dominios de interacción con PtdIns-4,5P₂ y cuando su interacción con él se ve comprometida se produce un defecto en el proceso endocítico (Aguilar *et al.*, 2003; Sun

et al., 2005), lo cual explicaría que la carencia de PtdIns-4,5P₂ por expresión de p110α-CAAX produzca dichas alteraciones.

Además la expresión de p110α-CAAX ocasiona la aparición de vacuolas con aspecto aberrante. Está descrito que las alteraciones a nivel del tráfico derivado de endosomas tempranos y tardíos y del TGN puede ocasionar la aparición de vacuolas fragmentadas y disgregadas de aspecto aberrante, llamadas de clase B (Conibear *et al.*, 2000; Bowers y Stevens, 2005), que va acompañada de defectos en la localización y estabilidad de proteínas del TGN así como en el reciclaje de la SNARE Snc1. La acumulación en vesículas citoplásmicas de Snc1 es, por otro lado, un reflejo del tráfico defectivo a través del aparato de Golgi (Lewis *et al.*, 2000). Por ello nos inclinamos a pensar que las alteraciones en la morfología vacuolar que se producen en ausencia de PtdIns-4,5P₂ están relacionadas con la fragmentación en el TGN y con el incremento en el tamaño de las vesículas de Snc1, y que todo ello sea la consecuencia de una disfunción en el tráfico intracelular.

Sin embargo, este fenotipo también podría producirse, no como consecuencia de un efecto de PI3K sobre el tráfico, sino por una posible influencia directa de la falta de PtdIns-4,5P₂ sobre la función vacuolar. Existen evidencias a través de trabajos realizados con mutantes en genes relacionados con la síntesis y metabolismo de PtdIns-4,5P₂ (Seeley *et al.*, 2002) que relacionan al PtdIns-4,5P₂ con la morfología vacuolar, por su participación en el proceso de fusión vacuolar (Mayer *et al.*, 2000) y en la regulación del citoesqueleto de actina (Rozelle *et al.*, 2000; Eitzen *et al.*, 2002).

Es difícil explicar cómo una molécula que se sintetiza en la membrana plasmática y ejerce sus funciones a este nivel pueda ser requerida para el correcto funcionamiento del tráfico intracelular de membranas. Es posible que esta molécula actúe como regulador de alguna de las GTPasas Arf y Rab que controlan el tráfico intracelular a estos niveles, tal como demostraron Randazzo y Kahn (1994) para la proteína de mamíferos ARF1. En levadura se ha descrito que mutantes que presentan una pérdida en la regulación de las GTPasas Arf a nivel del Golgi presentan fragmentación del TGN asociada a defectos en la endocitosis del colorante FM4-64 y en el reciclaje de Snc1 (Poon *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2006; Benjamin *et al.*, 2011). Pero también puede ser que el PtdIns-4,5P₂ desempeñe una función en orgánulos intracelulares. Ha *et al.* (2003)

demostraron utilizando un mutante carente de la fosfoinosítido 5-fosfatasa Sjl3/Inp53, el cual presenta niveles elevados de PtdIns-4,5P₂, que esta proteína regula el tráfico entre el TGN y compartimentos de la vía endocítica degradativa. Dado que Sjl3/Inp53 participa en la escisión de las vesículas endocíticas de la membrana plasmática mediante la eliminación de PtdIns-4,5P₂ (Stefan *et al.*, 2005), los autores hipotetizan que esta proteína podría también participar en la escisión de vesículas secretadas desde el TGN a través del mismo mecanismo, lo cual produciría defectos en el tráfico intracelular.

Por otro lado podría ser que la desaparición de este fosfoinosítido alterase el equilibrio en los niveles de otras especies fosfoinositídicas cuya influencia en el tráfico intracelular ya ha sido descrita (Shewan *et al.*, 2011), como por ejemplo del PtdIns-4P y PtdIns-3P, lípidos característicos del TGN y de la ruta endocítica, respectivamente. Otra explicación para este fenómeno consistiría en que el bloqueo en el proceso endocítico que desencadena la falta de PtdIns-4,5P₂ repercuta en la acumulación de cargos en el TGN que deberían ser degradados. De acuerdo con nuestros resultados, todas estas opciones podrían tener lugar en nuestra situación experimental.

La falta de PtdIns-4,5P₂ desencadena una activación persistente de la ruta CWI

En este trabajo también hemos demostrado que el PtdIns-4,5P₂ participa en la señalización celular en la célula de *S. cerevisiae* ya que su eliminación por expresión de p110α-CAAX desencadena la activación permanente de la ruta CWI. Existían evidencias previas que implicaban a esta especie lipídica en la señalización a través de esta ruta. Se ha descrito que la inactivación de la fosfatidilinositol 5-fosfatasa Inp51 ocasiona un incremento en los niveles de PtdIns-4,5P₂ (Stolz *et al.*, 1998b). La delección de *INP51* suprime los fenotipos de sensibilidad a temperatura que presentan los mutantes *wsc1Δ* y *rom2Δ*, lo cual según los autores se debe a un efecto negativo ejercido por esta fosfatasa, y, por tanto, por la falta de PtdIns-4,5P₂, sobre la ruta CWI (Morales-Johansson *et al.*, 2004). En este mismo sentido, el trabajo de Audhya y Emr (2002) reveló que, frente a un estímulo térmico, el PtdIns-4,5P₂ es esencial para la fosforilación de la MAPK de la ruta Slt2. Sin embargo, nuestros experimentos demuestran que la eliminación de PtdIns-4,5P₂ causa una activación de la ruta CWI y desencadena en la célula una reprogramación del perfil transcripcional acorde. Estas diferencias se deben

probablemente a que en el trabajo desarrollado por Audhya y Emr (2002) se emplean temperaturas elevadas, que estimulan la ruta CWI, para limitar la estabilidad de la versión termosensible de la quinasa Mss4. Este contexto experimental difiere, por tanto, del nuestro, pues estudia la regulación de la ruta CWI por PtdIns-4,5P₂ en unas condiciones en las que la homeostasis de la pared celular y de la membrana plasmática ya se encuentra de base alterada por efecto de la temperatura. Nuestro sistema se presenta como una alternativa para el estudio de la implicación de este fosfoinosítido en la transducción de señales a través de la ruta CWI en condiciones de temperatura óptimas para la célula. Pese a ello no debemos olvidar que para inducir la expresión de p110α-CAAX empleamos galactosa y ausencia de glucosa, lo cual podría afectar también en cierta medida a la pared celular. Sin embargo, el hecho de que no exista activación de la ruta cuando se expresa el mutante catalíticamente inactivo o cuando se realiza un tratamiento con el inhibidor 15e de PI3K en dichas condiciones, indica que la activación de dicha ruta que observamos en nuestro modelo es consecuencia únicamente de la actividad catalítica de p110α-CAAX.

A pesar de que la hiperactivación sostenida de la ruta CWI produce la inhibición del crecimiento de la levadura en numerosas circunstancias (Mattison *et al.*, 1999), en nuestro caso no parece ser esta la causa, dado que la falta de la MAPKKK Bck1 o de Slf2 no suprimen dicho efecto inhibitorio. De hecho, lo que sugieren nuestros datos es que la activación de la ruta CWI es un mecanismo mediante el cual la célula afronta la eliminación de este lípido esencial para la levadura. En estas condiciones, los elementos implicados en la transmisión de la señal a través de esta ruta son el receptor Wsc1, la GEF Rom2, la GTPasa Rho1 y la proteína quinasa Pkc1. Estos elementos constituyen un módulo inicial que puede señalizar a través de dos vías distintas: una, modulando la activación del módulo de MAPK CWI (Lee *et al.*, 1992; Kamada *et al.*, 1996), y otra, regulando la polaridad del citoesqueleto de actina (Delley *et al.*, 1999). Se ha descrito que el dominio PH de la GEF Rom2 es importante para la activación de Rho1 (Schmidt *et al.*, 1997; Bickle *et al.*, 1998) y que esta proteína se localiza en los sitios de crecimiento polarizado a través de la interacción con el PtdIns-4,5P₂ producido por Mss4 (Audhya *et al.*, 2002). Lorberg *et al.* (2001) encontraron un incremento en la fosforilación de Slf2 en un mutante carente del dominio PH de Rom2, y atribuyeron este resultado contradictorio a factores de variabilidad dependientes de la cepa y a que este mutante presentase una pared celular debilitada como consecuencia de una actividad reducida

de Pkc1. Sin embargo, en nuestro caso hemos visto cómo Rom2 participa en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂. La actividad de Rom2 está regulada además de por este segundo mensajero, por otras dos proteínas, Wsc1 y Tor2 (Schmidt *et al.*, 1997; Philip *et al.*, 2001), por lo que es muy posible, que en ausencia de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática, Rom2 continúe interaccionando con Wsc1, en lugares diferentes de los sitios de crecimiento polarizado, y sea capaz de transmitir la señal de activación a Rho1.

El hecho de que la falta de *WSC1* y de *ROM2* alivie la inhibición de crecimiento debida a la eliminación de PtdIns-4,5P₂ causada por Myr-p110α en levadura, pone de manifiesto que son parcialmente responsables de este efecto. Se ha descrito que la exposición de las células a un estrés térmico es percibido por el módulo constituido por Wsc1, Rom2, Rho1 y Pkc1, el cual provoca por un lado una despolarización transitoria del citoesqueleto de actina, posiblemente a través de efectores que regulan el citoesqueleto de actina, y por otro una activación transitoria de la ruta CWI, que tiene por objeto la repolarización del crecimiento (Delley *et al.*, 1999). Por analogía, podemos pensar que la pérdida de PtdIns-4,5P₂ producida por expresión de p110α-CAAX actuaría como un estrés para la célula, que sería percibido por el módulo constituido por Wsc1, Rom2, Rho1 y Pkc1. En los mutantes *wsc1Δ* o *rom2Δ* la célula no es capaz de percibir la falta de PtdIns-4,5P₂, lo que explica el efecto de supresión de la inhibición del crecimiento inducida por PI3K.

En condiciones de estrés térmico la activación del módulo de MAPK logra finalmente la repolarización del citoesqueleto de actina (Delley *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso de la sobreexpresión de PI3K, aunque se produzca una activación persistente de la ruta CWI, no se logra repolarizar el citoesqueleto, debido a que el PtdIns-4,5P₂ es necesario para esta estructura. La pérdida del fosfoinosítido que tiene lugar en las primeras horas de expresión de p110α-CAAX no es suficiente para la despolarización total del citoesqueleto, y ésta solo se hace evidente cuando se alcanzan niveles muy bajos de esta molécula. El efecto del PtdIns-4,5P₂ sobre la despolarización del citoesqueleto se puede explicar de dos maneras. La primera de ellas es que este fosfoinosítido regula directamente la función del citoesqueleto de actina y la segunda, es que participa en el control de la polaridad a través de la interacción específica con proteínas que controlan este proceso.

La actina es una proteína que se comporta de forma dinámica, polimerizándose o despolimerizándose de forma dependiente de numerosos factores reguladores cuya actividad en muchos casos depende de la unión a este fosfoinosítido (Lassing *et al.*, 1985; Lassing *et al.*, 1988; Rohatgi *et al.*, 2000). Esta podría ser la causa de la pérdida de polaridad del citoesqueleto a largo plazo que se observa en nuestras condiciones. Por ejemplo, es posible que los factores reguladores de la polimerización de actina como la profilina y cofilina, entre otros, tengan su actividad comprometida por no disponer de PtdIns-4,5P₂ al que unirse (Lassing *et al.*, 1985; Lassing *et al.*, 1988). Se sabe que la cofilina, la cual regula negativamente la polimerización de la actina, interacciona con la proteína CAP Srv2. Hemos visto que la ausencia de *SRV2* ocasiona una fuerte supresión de la inhibición de crecimiento ejercida por Myr-p110 α . Se ha descrito que los defectos en la formación de cables de actina y en la secreción polarizada debidos a mutaciones en la tropomiosina se suprimen precisamente mediante mutaciones en la maquinaria de desensamblaje de la actina, por ejemplo en el gen *SRV2* (Chaudhry *et al.*, 2013), al igual que en nuestro caso, o en *COF1* (Okada *et al.*, 2006). Los autores de estos estudios explican que los mutantes en tropomiosina contienen posiblemente cables de actina desorganizados y más cortos, y por ello las mutaciones en componentes implicados en el desensamblaje de actina suprimen estos defectos. Es muy posible que en el mutante *srv2Δ* los defectos en la polimerización de actina se vean atenuados y ello suprima la inhibición de crecimiento causada por PI3K.

Por otro lado, el PtdIns-4,5P₂ es en sí mismo una señal de polaridad porque confiere identidad a la membrana plasmática y por ello está directamente relacionado con el mantenimiento de la asimetría en la célula, no solo en la levadura *S. cerevisiae*, sino también en eucariotas superiores (Martin-Belmonte y Mostov, 2007; Schill y Anderson, 2009; Thapa y Anderson, 2012). Esta molécula coopera en levadura junto con las GTPasas pequeñas en el establecimiento de la polaridad celular. Orlando *et al.* (2008) probaron que Cdc42 y el PtdIns-4,5P₂ controlan la localización polarizada de su efector Gic2. Asimismo, Yakir-Tamang y Gerst (2009) demostraron que el PtdIns-4,5P₂ regula el citoesqueleto de actina y la secreción polarizada mediada por Cdc42. Las subunidades del exocisto Exo70 y Sec3, que actúan de forma independiente del citoesqueleto de actina (Boyd *et al.*, 2004) como referencia para la llegada del resto de los componentes del complejo (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), también reconocen la membrana a través de su interacción con PtdIns-4,5P₂. Se ha descrito que mutantes en la zona de

unión a fosfoinosítidos de Exo70 y Sec3 presentan defectos en el anclaje, pero no en la polarización, del exocisto a la membrana plasmática (Baek *et al.*, 2010). Las anomalías en el anclaje de los diversos componentes del exocisto en condiciones de expresión de PI3K que hemos observado concuerdan con estas evidencias. Probablemente la falta de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática impida igualmente el reconocimiento por parte de las vesículas secretoras de las zonas de la membrana plasmática donde deben fusionarse.

Rho1 regula el crecimiento polarizado de la célula de levadura a través de la activación de la subunidad del exocisto Sec3 (Guo *et al.*, 2001), de la glucán sintasa Fks1 (Qadota *et al.*, 1996; Mazur *et al.*, 1996) y de la formina Bni1 (Kohno *et al.*, 1996), la cual parece estar regulada asimismo por Pkc1. La activación de estas proteínas transcurre en la membrana plasmática en los sitios de crecimiento polarizado (Yamochi *et al.*, 1994), donde se precisa su actividad para el remodelado y síntesis de la pared celular de la levadura y la reorganización del citoesqueleto de actina. La eliminación drástica de PtdIns-4,5P₂ altera la identidad de las membranas en las que normalmente tiene lugar la activación de Rho1, lo que puede afectar a la localización y activación de sus efectores. De hecho, ni Rho1 ni Pkc1 se localizan en sitios de crecimiento polarizado en estas condiciones. Muchos efectores de GTPasas Rho/Rab requieren la presencia de especies concretas de fosfoinosítidos en las membranas para reconocer de manera eficiente la forma unida a GTP de la GTPasa, formando una interacción dual con ambas moléculas: GTPasa activada y fosfoinosítido (Di Paolo *et al.*, 2006). Es posible que Pkc1 pueda prescindir de dicha interacción dual, mientras que otros efectores de Rho1 requieran la presencia a nivel local de PtdIns-4,5P₂ para su reclutamiento.

De manera acorde con la estimulación de la ruta CWI, el perfil transcriptómico obtenido en condiciones de eliminación sostenida de PtdIns-4,5P₂ presenta bastante similitud con el que generan diversos daños en la pared celular, que depende principalmente del factor de transcripción Rlm1 y se caracteriza por la inducción genes relacionados con la biogénesis de esta estructura. El trabajo realizado por García *et al.* (2004b) caracterizó la respuesta transcripcional que se genera en respuesta a diferentes tipos de estrés en la pared celular y puso de manifiesto la existencia de un grupo de 20 genes que se inducen en todas las condiciones evaluadas en dicho trabajo, y que conforman un patrón distintivo, a nivel transcripcional, de la activación de la ruta CWI. En condiciones de

eliminación de PtdIns-4,5P₂ existen 15 de esos 20 genes (*PRM5*, *PIR3*, *SLR3*, *YPL088W*, *MLP1*, *SLT2*, *YLR194C*, *KTR2*, *YIL023C*, *YPS4*, *YHR097C*, *GFA1*, *YLR414C*, *FBP26* y *CWP1*) inducidos, además de otros genes inducidos solo en algunas condiciones de daño transitorio (García *et al.*, 2004b), como por ejemplo *CRG1*, *YGL157W*, *PRM10*, *NQM1*, *AFR1*, *YLR042C*, *HAL1*, *YGR146C*, *PTP2* y *PEP12*.

Existen varios argumentos que permiten explicar que en nuestra situación experimental tenga lugar la activación de esta ruta. Como se ha mencionado, la fosforilación de la MAPK Slt2 se desencadena como una respuesta de las células expresando p110α-CAAX. Por una parte, los defectos en la polarización del citoesqueleto, que dirige la secreción polarizada, así como en el anclaje de las vesículas secretoras por el exocisto, producirían un debilitamiento de la pared celular de *S. cerevisiae* que estimularía la activación de la ruta CWI. Adicionalmente, los defectos en la endocitosis que aparecen en estas células podrían contribuir negativamente a la integridad de la pared celular, teniendo en cuenta que este mecanismo regula en parte la presencia de proteínas en la membrana plasmática. De hecho, se ha descrito que la inhibición de la endocitosis de Wsc1 ocasiona la pérdida de su localización polarizada en la membrana plasmática, defectos en la deposición de la pared celular y un aumento en la sensibilidad a agentes que actúan sobre la pared celular (Piao *et al.*, 2007; Wilk *et al.*, 2010).

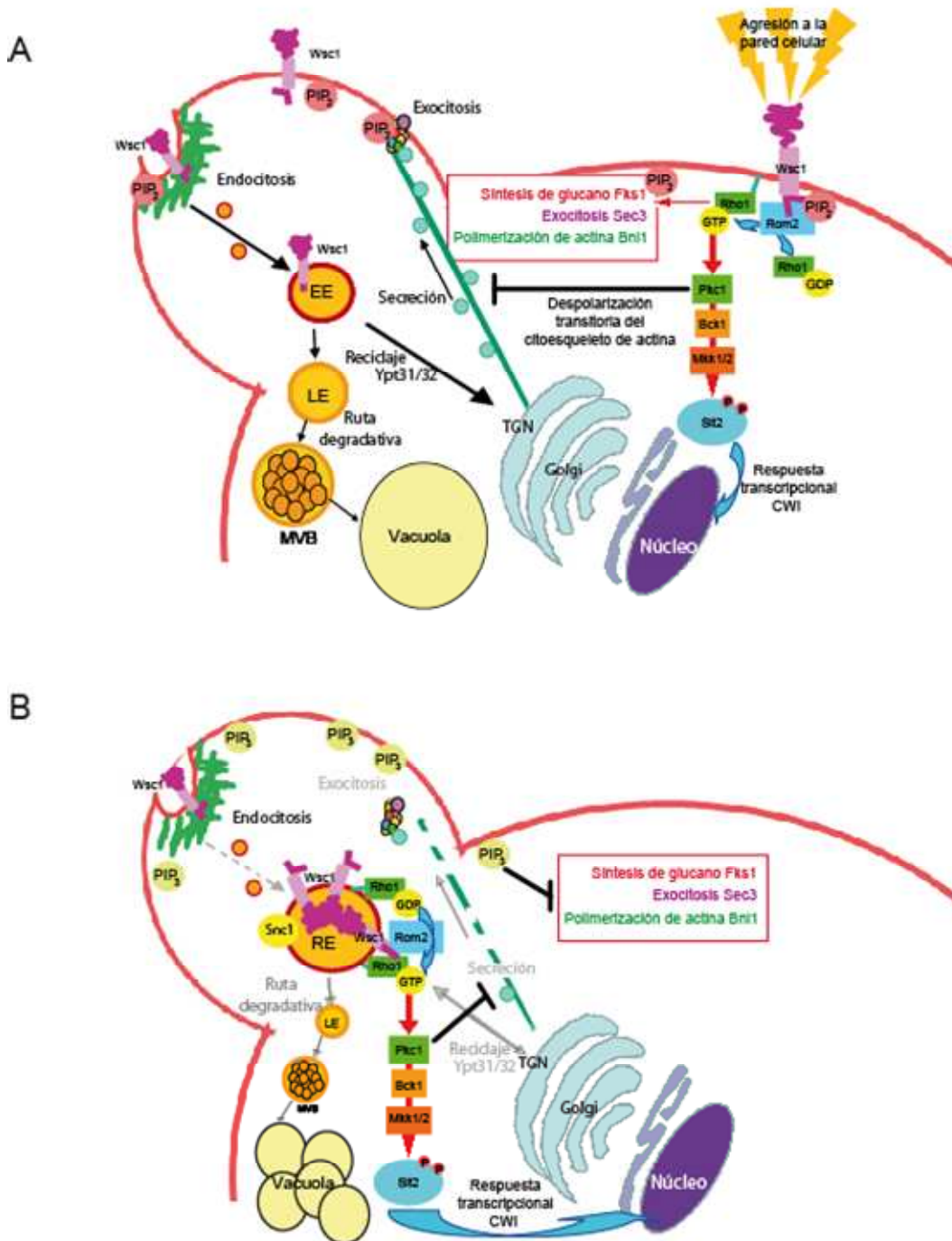
Los rastreos genómicos a gran escala empleando colecciones de mutantes han aportado importantes contribuciones al conocimiento de la fisiología de *S. cerevisiae* (Scherens *et al.*, 2004), como por ejemplo la relación de nuevos genes con la regulación de la actina, de la pared celular y de la síntesis y reparación del DNA (Tong *et al.*, 2004), de la longevidad celular (Fabrizio *et al.*, 2010) y de la homeostasis del equilibrio redox (Ayer *et al.*, 2012). Nuestros resultados utilizando esta estrategia indican una relación funcional del PtdIns-4,5P₂ con la señalización a través de la ruta CWI y con el citoesqueleto de actina. Estos datos refuerzan las evidencias acerca de la relación de este fosfonosítilo con dichos procesos, halladas en este trabajo mediante otras aproximaciones. Aunque será necesario corroborar estos resultados individualmente, este rastreo nos ha permitido además encontrar nuevas interacciones genéticas que aportan evidencias acerca de otros posibles efectores no conocidos de PtdIns-4,5P₂, como por ejemplo genes implicados en el procesamiento de mRNA. Se ha descrito que las condiciones de estrés térmico, entre otras, inhiben el procesamiento del mRNA (Vogel *et al.*, 1995;

Pleiss *et al.*, 2007; Bergkessel *et al.*, 2011) para evitar la acumulación de productos aberrantes que hayan sido procesados y traducidos erróneamente (Yost y Lindquist, 1988). Quizás, en la situación de estrés que desencadena la falta de PtdIns-4,5P₂, la ausencia de genes implicados en el procesamiento de mRNA reduzca la expresión de proteínas relacionadas con la toxicidad producida por Myr-p110 α . Además, como se comentará en el siguiente apartado, también hemos encontrado una relación entre la falta de PtdIns-4,5P₂ y mutantes en genes implicados en la traducción proteica o el aparato de Golgi.

La activación de la ruta CWI en ausencia de PtdIns-4,5P₂ se produce desde endosomas de reciclaje

La expresión de PI3K genera un contexto celular para la activación de la ruta CWI que difiere en algunos aspectos con el modelo canónico de activación de esta vía en la membrana plasmática (Figura 53). La localización polarizada de Pkc1 está regulada a través de la GTPasa Rho1 y del citoesqueleto de actina (Andrews *et al.*, 2000). En este trabajo hemos visto cómo el tratamiento con estímulos de la ruta CWI puede alterar la localización de Pkc1, ocasionando un incremento en la intensidad de la señal fluorescente en sitios de polaridad, en el caso del tratamiento con zimoliasa, o bien la pérdida de polaridad y su distribución por toda la periferia, en el caso de la exposición a un estímulo térmico, tal como ya había sido descrito por Andrews *et al.* (2000). El tratamiento oxidante con diamida, que también supone un estímulo para la ruta CWI, produce asimismo la pérdida de polaridad de Pkc1 (Vilella *et al.*, 2005). Estos autores interpretan este fenómeno de manera análoga a la hipótesis propuesta por Delley *et al.* (1999), como una respuesta transitoria de la célula al estrés que causa la despolarización de varios de los elementos implicados en el control del crecimiento polarizado de la célula de *S. cerevisiae*, es decir, el citoesqueleto de actina, la glucán sintasa Fks1 y Rho1.

La presencia intracelular de Pkc1 se ha descrito en el núcleo y en el huso mitótico (Denis *et al.*, 2005), pero nunca antes en endosomas de reciclaje como los que se aprecian en nuestras condiciones experimentales. Éstos siguen una ruta regulada por las Rab GTPasas Ypt31 e Ypt32, al igual que otros cargos como la vSNARE Snc1 (Chen *et al.*, 2005). Además, hemos demostrado que el citoesqueleto de actina participa en la localización de Pkc1 en estos compartimentos, lo cual resulta congruente teniendo en



cuenta que se generan por fusión de vesículas que proceden de la endocitosis de la membrana plasmática. La ruta de reciclaje regulada por Ypt31 e Ypt32 implica el tránsito de los cargos desde los endosomas tempranos a través del TGN para ser redirigidos a la membrana plasmática (Figura 53). En este sentido, resulta particularmente interesante que en el rastreo genómico se hayan aislado como potenciadores del fenotipo ejercido por Myr-p110 α mutaciones en genes que desempeñan una función importante en el tráfico vesicular intra-Golgi como, *GDA1* o *MNN10*, o que regulan más directamente la

secreción polarizada desde este orgánulo, como *BCH2* o *RCY1*. Precisamente Rcy1 es un efector de las GTPasas Ypt31/32 que junto a ellas regula el reciclaje de proteínas de la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2005; Furuta *et al.*, 2007), como Snc1, y que se localiza de forma polarizada (Galan *et al.*, 2001). Esto podría explicar la razón de que la ausencia de Rcy1 agrave la inhibición de crecimiento en condiciones de ausencia de PtdIns-4,5P₂.

La coincidencia de Pkc1 en estos compartimentos con otros componentes de la ruta CWI, como el receptor Wsc1 y la GTPasa Rho1, indica que es muy posible que desde este lugar sean capaces de transmitir la señal de activación al módulo de MAPK (Figura 53), ya que la fosforilación de Slt2 persiste en el tiempo en estas condiciones y la ausencia de Wsc1, Rom2, Rho1 y de Pkc1 la reduce drásticamente. El hecho de que el tratamiento con el inhibidor 15e anule la formación de estos compartimentos y restaure la localización polarizada de Pkc1 es una evidencia de que todo ello se debe al efecto de la expresión de p110 α -CAAX y que el proceso es reversible en cuanto se restauran los niveles de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática.

¿Por qué se produce la acumulación de estas proteínas en estos endosomas de reciclaje? Pensamos que esta ruta de reciclaje se encuentra alterada en ausencia de PtdIns-4,5P₂, quizás como consecuencia de los defectos en la endocitosis y en la

Fig.53. Representación esquemática de los procesos que transcurren en presencia y en ausencia de PtdIns-4,5P₂ en la célula de levadura. (A) En condiciones normales, cuando se produce una agresión a la pared celular la ruta CWI se estimula y se produce una despolarización transitoria de los elementos implicados en el crecimiento polarizado de la célula, es decir, la glucán sintasa Fks1, la subunidad del exocisto Sec3 y la formina Bni1, todos ellos efectores de la GTPasa Rho1. Esta despolarización está mediada por el módulo constituido por el receptor Wsc1, el GEF Rom2, la GTPasa Rho1 y la proteína quinasa Pkc1. La estimulación de la MAPK Slt2 logra repolarizar el crecimiento de la célula a medio plazo. Además la presencia de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática hace que la endocitosis y la exocitosis transcurran con normalidad. (B) En condiciones de eliminación de PtdIns-4,5P₂ inducidas por expresión de PI3K, la activación del módulo de MAPK no logra repolarizar el citoesqueleto de actina, debido a que esta estructura lo necesita para su funcionamiento. Además, en estas condiciones se producen alteraciones en el tráfico intracelular que ocasionan la fragmentación de las vacuolas además de la aparición de compartimentos endocíticos de reciclaje en las que Wsc1, Rom2, Rho1 y Pkc1 se incorporan junto con la proteína Snc1 y las Rab GTPasas Ypt31/32, desde los cuales se produce la señalización hacia el módulo de MAPK. La identidad de la membrana plasmática se ve alterada en condiciones de sustitución de PtdIns-4,5P₂ por PtdIns-3,4,5P₃, y, por tanto, los procesos que se ejecutan a este nivel como el anclaje de las vesículas exocíticas y la activación de los efectores de Rho1, necesarios para crecimiento polarizado de la célula de levadura, se ven afectados. EE, endosoma temprano; LE, endosoma tardío; MVB, cuerpos multivesiculares.

secreción polarizada que tienen lugar simultáneamente. Se ha descrito que mutantes que presentan defectos en el transporte desde los endosomas tempranos hacia el TGN, manifiestan una retención en compartimentos citoplásmicos de las proteínas reguladas por esta ruta de reciclaje, como por ejemplo Snc1, así como una morfología vacuolar anormal (Sakane *et al.*, 2006). Además los endosomas de reciclaje en que se ubica Pkc1 no co-localizan con el marcador del TGN Sec7, lo que implica que no circulan a través de este orgánulo. Es posible que en condiciones normales las proteínas que se encuentran en estos endosomas de reciclaje transiten a través de esta ruta endo-exocítica y por ello queden acumulados en estos compartimentos cuando se interrumpe el tráfico a este nivel. Por ejemplo, la localización de la quitín sintasa Chs3 en lugares de crecimiento polarizado requiere esta ruta de reciclaje y el bloqueo del tráfico en el aparato de Golgi ocasiona su acumulación en compartimentos citoplásmicos (Ortiz y Novick, 2006). La endocitosis y el reciclaje del receptor Wsc1 también desempeñan un importante papel en su localización y función en sitios de crecimiento polarizado, y el bloqueo de este proceso ocasiona asimismo su aparición en compartimentos internos (Piao *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha descrito que los defectos en la secreción originan en la célula de levadura una represión de la síntesis de ribosomas que parece estar mediada por Wsc1 y Pkc1 a través de un mecanismo desconocido (Nanduri *et al.*, 1999; Nierras y Warner, 1999; Li *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003). La interacción genética de la expresión de PI3K con seis mutantes en genes relacionados con la traducción proteica podría estar sugiriendo que el defecto en el tráfico intracelular ocasionado por la privación de PtdIns-4,5P₂ desencadena una represión en la síntesis de ribosomas, lo cual explica el agravamiento de la inhibición del crecimiento en dichos mutantes.

Lo sorprendente de nuestros resultados consiste en que, en el contexto experimental de sobreexpresión de PI3K, Rho1 y Pkc1 se encuentren activados en estos endosomas de reciclaje. Éstos recibirían vesículas endocíticas procedentes de la membrana plasmática que expondrían en su cara citoplásmica al receptor Wsc1, a la propia Rho1 y, tal vez, a su efector, Pkc1. Aunque se ha descrito la presencia de Rho1 en vesículas secretoras que están siendo transportadas a la membrana plasmática, ésta no es capaz de activar a su efector Fks1 en estos lugares debido probablemente a la ausencia de su GEF Rom2, que en condiciones fisiológicas se encuentra en la membrana plasmática, probablemente gracias al reconocimiento del PtdIns-4,5P₂ por su dominio PH (Abe *et al.*, 2003), y no en estas vesículas. Existen evidencias que prueban que Rho1 y Pkc1 pueden ejercer

funciones relacionadas con el tráfico intracelular. Se ha descrito que la activación de Rho1 junto con Pkc1, pero no del módulo de MAPK, controla la salida del TGN de algunos cargos, como por ejemplo la quitín sintasa Chs3 en circunstancias de estrés térmico, lo que implica que estas proteínas pueden ejercer funciones relacionadas con el tráfico específico de proteínas necesarias para la biosíntesis de la pared celular en respuesta a un estímulo (Valdivia y Schekman, 2003).

En células de mamíferos, los eventos iniciales de señalización no están restringidos a la membrana plasmática sino que existen numerosos ejemplos de receptores que siguen transmitiendo la señal una vez se internalizan. De hecho, se ha descrito que son capaces de prolongar la señalización desde compartimentos intracelulares siempre y cuando no sean englobados en el lumen de las vesículas endocíticas, y que la composición de las membranas endocíticas resulta favorable para ello (Miaczynska *et al.*, 2004; Hoeller *et al.*, 2005; Polo y Di Fiore, 2006; von Zastrow y Sorkin, 2007; Sadowski *et al.*, 2009). Por ejemplo, la internalización mediada por clatrina de los receptores tirosín-quinasa en respuesta a su estimulación con insulina es necesaria para la total activación de las MAPK Erk1/2 en las células de mamífero (Ceresa *et al.*, 1998). Resulta interesante el caso del receptor CSF1-R (*colony stimulating factor-1 receptor*), que regula la proliferación y diferenciación de los macrófagos en respuesta a CSF-1, para el que se ha demostrado que su capacidad de señalización desde los endosomas está directamente relacionada con la activación sostenida de las MAPKs Erk1/2, de la proteína quinasa Akt y la expresión de genes relacionados con la proliferación (Huynh *et al.*, 2012).

En resumen, nuestros resultados experimentales sugieren una estimulación de la ruta CWI en una localización endosomal alternativa como consecuencia de la eliminación de PtdIns-4,5P₂ en la membrana plasmática. Además refuerzan el papel de este fosfolípido como marcador de identidad de la membrana plasmática en procesos de tráfico vesicular, como la endocitosis y la exocitosis, los cuales son esenciales para un equilibrio adecuado en la distribución celular de proteínas importantes para el crecimiento polarizado. El módulo constituido por Wsc1, Rom2, Rho1 y Pkc1 presentaría la capacidad de percibir la ausencia de PtdIns-4,5P₂ y, como respuesta, desencadenaría la despolarización del citoesqueleto de actina. A su vez la pérdida de función del citoesqueleto de actina repercutiría en la alteración de la endocitosis y la secreción polarizada. Esto, en definitiva, causaría diversos defectos en el tráfico intracelular que

provocarían la acumulación citoplásmica de los endosomas de reciclaje que contienen Ypt31/32, Snc1, Wsc1, Rho1 y Pkc1 (Figura 53). Desde éstos, dichos componentes de la ruta CWI señalarían a los elementos que se encuentran por debajo en la cascada. La activación de esta ruta tendría una función importante para que la célula pudiera sobrevivir mientras se mantuviera esta agresión.

Globalmente, este trabajo pone de manifiesto la relevancia de la levadura como organismo modelo tanto en investigación básica como aplicada a proteínas implicadas en enfermedades humanas. Su simplicidad, fácil manejo y la disponibilidad de numerosas herramientas genéticas, la convierte en un importante complemento a la investigación en organismos superiores. Estas cualidades facilitan el establecimiento de conclusiones y modelos que nos ayudan a comprender mejor el funcionamiento de la célula eucariótica.

CONCLUSIONES

1. El empleo de la cepa mutante *snq2Δ* y la presencia de 0,003% del detergente SDS optimiza la sensibilidad del bioensayo de inhibición de PI3K en la levadura *S. cerevisiae*, basado en la recuperación del defecto en crecimiento causado por la expresión de p110α-CAAX.
2. De los cinco inhibidores comerciales de PI3K ensayados, los compuestos 15e y PI-103 han resultado ser los más potentes en este bioensayo.
3. El uso del bioensayo para detectar compuestos inhibidores de Akt requiere la co-expresión de p110α con Akt1 en un mutante *vip1Δ*.
4. La calidad, reproducibilidad y robustez del bioensayo de inhibición de PI3K en levadura para rastreos a gran escala se ha demostrado con la identificación de 55 extractos de origen microbiano con esta actividad inhibitoria entre 9600 ensayados.
5. Los residuos Lys410, Arg412, Lys413 y Lys416 del dominio C2 son necesarios para la inhibición de crecimiento causada por p110α en levadura, siendo dispensable el dominio de interacción con Ras (RBD).
6. La introducción en p110α de una señal N-terminal de miristoilación ocasiona una inhibición de crecimiento de la levadura menos drástica que la de una señal C-terminal de prenilación.
7. La eliminación de PtdIns-4,5P₂ debida a la actividad catalítica de p110α-CAAX provoca la pérdida de la polaridad del citoesqueleto de actina, defectos en el anclaje del exocisto a la membrana plasmática, retardo en el tráfico endocítico intracelular y alteraciones en la morfología vacuolar y del *trans*-Golgi en la levadura.
8. La falta de PtdIns-4,5P₂ causa una activación persistente de la ruta CWI en *S. cerevisiae*, dependiente del receptor Wsc1, la GEF Rom2, la GTPasa Rho1 y la proteína quinasa Pkc1, y una respuesta transcripcional acorde con la estimulación de esta ruta.
9. Pkc1 co-localiza con Wsc1 y Rho1 en estas condiciones, en las que se encuentra junto a las Rab GTPasas Ypt31/32 y la vSNARE Snc1 en endosomas de reciclaje, de forma dependiente del citoesqueleto de actina.
10. La activación de la ruta CWI y la localización anómala de Pkc1 son consecuencia de la actividad catalítica de p110α-CAAX, ya que se reducen mediante el tratamiento con el inhibidor comercial de PI3K 15e.

11. La inhibición parcial del crecimiento causada por Myr-p110 α se agrava en mutantes carentes de genes relacionados con la traducción proteica y de componentes del aparato de Golgi y, en cambio, se alivia en mutantes carentes de genes relacionados con el procesamiento del RNA y de componentes de la ruta CWI.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe,M., Qadota,H., Hirata,A., and Ohya,Y. (2003). Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **162**, 85-97.
- Aguilar,R.C., Watson,H.A., and Wendland,B. (2003). The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10737-10743.
- Aguisa-Toure,A.H. and Li,G. (2012). Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol. Life Sci.*, **69**, 1475-1491.
- Alberts,A.S., Bouquin,N., Johnston,L.H., and Treisman,R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8616-8622.
- Alessi,D.R., James,S.R., Downes,C.P., Holmes,A.B., Gaffney,P.R., Reese,C.B., and Cohen,P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.*, **7**, 261-269.
- Alto,N.M., Shao,F., Lazar,C.S., Brost,R.L., Chua,G., Mattoo,S., McMahon,S.A., Ghosh,P., Hughes,T.R., Boone,C., and Dixon,J.E. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.*, **124**, 133-145.
- Altomare,D.A. and Khaled,A.R. (2012). Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr. Med. Chem.*, **19**, 3748-3762.
- Andres-Pons,A., Rodriguez-Escudero,I., Gil,A., Blanco,A., Vega,A., Molina,M., Pulido,R., and Cid,V.J. (2007). In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN. *Cancer Res.*, **67**, 9731-9739.
- Andrews,P.D. and Stark,M.J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.*, **113**, 2685-2693.
- Andrusiak,K., Piotrowski,J.S., and Boone,C. (2012). Chemical-genomic profiling: systematic analysis of the cellular targets of bioactive molecules. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 1952-1960.
- Antonsson,B., Montessuit,S., Friedli,L., Payton,M.A., and Paravicini,G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16821-16828.
- Aoh,Q.L., Graves,L.M., and Duncan,M.C. (2011). Glucose regulates clathrin adaptors at the trans-Golgi network and endosomes. *Mol. Biol. Cell.*, **22**, 3671-3683.

- Aoyagi,T. and Matsui,T. (2011). Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1818-1824.
- Arcaro,A. and Wymann,M.P. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.*, **296**, 297-301.
- Arnoldo,A., Curak,J., Kittanakom,S., Chevelev,I., Lee,V.T., Sahebol-Amri,M., Kosciak,B., Ljuma,L., Roy,P.J., Bedalov,A., Giaever,G., Nislow,C., Merrill,A.R., Lory,S., and Stagljar,I. (2008). Identification of small molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S using a yeast phenotypic screen. *PLoS. Genet.*, **4**, e1000005.
- Arpino,G., Green,S.J., Allred,D.C., Lew,D., Martino,S., Osborne,C.K., and Elledge,R.M. (2004). HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 5670-5676.
- Audhya,A. and Emr,S.D. (2002). Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev. Cell.*, **2**, 593-605.
- Audhya,A., Foti,M., and Emr,S.D. (2000). Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 2673-2689.
- Audhya,A., Loewith,R., Parsons,A.B., Gao,L., Tabuchi,M., Zhou,H., Boone,C., Hall,M.N., and Emr,S.D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.*, **23**, 3747-3757.
- Ausubel, F.M.,Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1993). *Current protocols in Molecular Biology*
- Ayer,A., Fellermeier,S., Fife,C., Li,S.S., Smits,G., Meyer,A.J., Dawes,I.W., and Perrone,G.G. (2012). A genome-wide screen in yeast identifies specific oxidative stress genes required for the maintenance of sub-cellular redox homeostasis. *PLoS. One.*, **7**, e44278.
- Ayscough,K.R. (2000). Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr. Biol.*, **10**, 1587-1590.
- Baek,K., Knodler,A., Lee,S.H., Zhang,X., Orlando,K., Zhang,J., Foscett,T.J., Guo,W., and Dominguez,R. (2010). Structure-function study of the N-terminal domain of exocyst subunit Sec3. *J. Biol. Chem.*, **285**, 10424-10433.
- Baines,A.T., Xu,D., and Der,C.J. (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future. Med. Chem.*, **3**, 1787-1808.
- Balderhaar,H.J., Arlt,H., Ostrowicz,C., Brocker,C., Sundermann,F., Brandt,R., Babst,M., and Ungermann,C. (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-

- mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J. Cell Sci.*, **123**, 4085-4094.
- Baldi,P. and Long,A.D. (2001). A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics.*, **17**, 509-519.
 - Bard,M., Lees,N.D., Burrows,L.S., and Kleinhans,F.W. (1978). Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *J. Bacteriol.*, **135**, 1146-1148.
 - Barlow,C.A., Laishram,R.S., and Anderson,R.A. (2010). Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends Cell Biol.*, **20**, 25-35.
 - Becherer,K.A., Rieder,S.E., Emr,S.D., and Jones,E.W. (1996). Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **7**, 579-594.
 - Bellacosa,A., de Feo,D., Godwin,A.K., Bell,D.W., Cheng,J.Q., Altomare,D.A., Wan,M., Dubeau,L., Scambia,G., Masciullo,V., Ferrandina,G., Benedetti,P.P., Mancuso,S., Neri,G., and Testa,J.R. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer.*, **64**, 280-285.
 - Benjamin,J.J., Poon,P.P., Drysdale,J.D., Wang,X., Singer,R.A., and Johnston,G.C. (2011). Dysregulated Arl1, a regulator of post-Golgi vesicle tethering, can inhibit endosomal transport and cell proliferation in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **22**, 2337-2347.
 - Benli,M., Doring,F., Robinson,D.G., Yang,X., and Gallwitz,D. (1996). Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J.*, **15**, 6460-6475.
 - Bergkessel,M., Whitworth,G.B., and Guthrie,C. (2011). Diverse environmental stresses elicit distinct responses at the level of pre-mRNA processing in yeast. *RNA.*, **17**, 1461-1478.
 - Bermejo,C., Garcia,R., Straede,A., Rodriguez-Pena,J.M., Nombela,C., Heinisch,J.J., and Arroyo,J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS.*, **14**, 679-688.
 - Beukers,M.W. and Ijzerman,A.P. (2005). Techniques: how to boost GPCR mutagenesis studies using yeast. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 533-539.
 - Bharadwaj,P., Martins,R., and Macreadie,I. (2010). Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.*, **10**, 961-969.
 - Bi,E. and Park,H.O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics.*, **191**, 347-387.

- Bickle,M., Delley,P.A., Schmidt,A., and Hall,M.N. (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.*, **17**, 2235-2245.
- Bilsland,E., Pir,P., Gutteridge,A., Johns,A., King,R.D., and Oliver,S.G. (2011). Functional expression of parasite drug targets and their human orthologs in yeast. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, **5**, e1320.
- Bjornsti,M.A. (2002). Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell.*, **2**, 267-273.
- Bjornsti,M.A. and Houghton,P.J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, **4**, 335-348.
- Boldyreff,B., Rasmussen,T.L., Jensen,H.H., Cloutier,A., Beaudet,L., Roby,P., and Issinger,O.G. (2008). Expression and purification of PI3 kinase alpha and development of an ATP depletion and an alphascreen PI3 kinase activity assay. *J. Biomol. Screen.*, **13**, 1035-1040.
- Botstein,D. and Fink,G.R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics.*, **189**, 695-704.
- Bowers,K. and Stevens,T.H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1744**, 438-454.
- Boyd,C., Hughes,T., Pypaert,M., and Novick,P. (2004). Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.*, **167**, 889-901.
- Braccini,L., Ciralo,E., Martini,M., Pirali,T., Germena,G., Rolfo,K., and Hirsch,E. (2012). PI3K keeps the balance between metabolism and cancer. *Adv. Biol. Regul.*, **52**, 389-405.
- Braun,R.J., Buttner,S., Ring,J., Kroemer,G., and Madeo,F. (2010). Nervous yeast: modeling neurotoxic cell death. *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 135-144.
- Brunet,A., Bonni,A., Zigmond,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., and Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.*, **96**, 857-868.
- Burd,C.G., Peterson,M., Cowles,C.R., and Emr,S.D. (1997). A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 1089-1104.
- Burke,J.E., Perisic,O., Masson,G.R., Vadas,O., and Williams,R.L. (2012). Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 15259-15264.

- Buvelot,F.S., Rahl,P.B., Nussbaum,M., Briggs,B.J., Calero,M., Janeczko,S., Regan,A.D., Chen,C.Z., Barral,Y., Whittaker,G.R., and Collins,R.N. (2006). Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 7299-7317.
- Cabrera,M., Arlt,H., Epp,N., Lachmann,J., Griffith,J., Perz,A., Reggiori,F., and Ungermann,C. (2013). Functional separation of endosomal fusion factors and the class C core vacuole/endosome tethering (CORVET) complex in endosome biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **288**, 5166-5175.
- Cabrera,M., Langemeyer,L., Mari,M., Rethmeier,R., Orban,I., Perz,A., Brocker,C., Griffith,J., Klose,D., Steinhoff,H.J., Reggiori,F., Engelbrecht-Vandre,S., and Ungermann,C. (2010). Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *J. Cell Biol.*, **191**, 845-859.
- Cai,H., Reinisch,K., and Ferro-Novick,S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell.*, **12**, 671-682.
- Calleja,V., Laguerre,M., Parker,P.J., and Larijani,B. (2009). Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS. Biol.*, **20**;7, e17.
- Campellone,K.G. and Welch,M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 237-251.
- Cantley,L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655-1657.
- Capon,R.J. (2012). Microbial biodiscovery: back to the future. *Curr. Top. Med. Chem.*, **12**, 1471-1478.
- Cardone,M.H., Roy,N., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., Franke,T.F., Stanbridge,E., Frisch,S., and Reed,J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.*, **282**, 1318-1321.
- Carmona-Gutierrez,D., Eisenberg,T., Buttner,S., Meisinger,C., Kroemer,G., and Madeo,F. (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death. Differ.*, **17**, 763-773.
- Carmona-Saez,P., Chagoyen,M., Tirado,F., Carazo,J.M., and Pascual-Montano,A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.*, **8**, R3.
- Carpten,J.D., Faber,A.L., Horn,C., Donoho,G.P., Briggs,S.L., Robbins,C.M., Hostetter,G., Boguslawski,S., Moses,T.Y., Savage,S., Uhlik,M., Lin,A., Du,J., Qian,Y.W., Zeckner,D.J., Tucker-Kellogg,G., Touchman,J., Patel,K., Mousses,S., Bittner,M., Schevitz,R., Lai,M.H., Blanchard,K.L., and Thomas,J.E. (2007). A

- transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.*, **448**, 439-444.
- Carson,J.D., Van Aller,G., Lehr,R., Sinnamon,R.H., Kirkpatrick,R.B., Auger,K.R., Dhanak,D., Copeland,R.A., Gontarek,R.R., Tummino,P.J., and Luo,L. (2008). Effects of oncogenic p110alpha subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.*, **409**, 519-524.
 - Casamayor,A., Torrance,P.D., Kobayashi,T., Thorner,J., and Alessi,D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.*, **9**, 186-197.
 - Castellano,E. and Downward,J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **346:143-69**. doi: 10.1007/82_2010_56., 143-169.
 - Ceresa,B.P., Kao,A.W., Santeler,S.R., and Pessin,J.E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3862-3870.
 - Chaudhry,F., Breitsprecher,D., Little,K., Sharov,G., Sokolova,O., and Goode,B.L. (2013). Srv2/cyclase-associated protein forms hexameric shurikens that directly catalyze actin filament severing by cofilin. *Mol. Biol. Cell.*, **24**, 31-41.
 - Chen,S.H., Chen,S., Tokarev,A.A., Liu,F., Jedd,G., and Segev,N. (2005). Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Mol. Biol. Cell.*, **16**, 178-192.
 - Cheng,J.Q., Godwin,A.K., Bellacosa,A., Taguchi,T., Franke,T.F., Hamilton,T.C., Tsichlis,P.N., and Testa,J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9267-9271.
 - Cheung,L.W., Hennessey,B.T., Li,J., Yu,S., Myers,A.P., Djordjevic,B., Lu,Y., Stemke-Hale,K., Dyer,M.D., Zhang,F., Ju,Z., Cantley,L.C., Scherer,S.E., Liang,H., Lu,K.H., Broaddus,R.R., and Mills,G.B. (2011). High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov.*, **1**, 170-185.
 - Chung,C.Y., Khurana,V., Auluck,P.K., Tardiff,D.F., Mazzulli,J.R., Soldner,F., Baru,V., Lou,Y., Freyza,Y., Cho,S., Mungenast,A.E., Muffat,J., Mitalipova,M., Pluth,M.D., Jui,N.T., Schule,B., Lippard,S.J., Tsai,L.H., Krainc,D., Buchwald,S.L., Jaenisch,R., and Lindquist,S. (2013). Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science.*, **342**, 983-987.
 - Cleves,A.E., Novick,P.J., and Bankaitis,V.A. (1989). Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J. Cell Biol.*, **109**, 2939-2950.

- Conibear,E., Cleck,J.N., and Stevens,T.H. (2003). Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p. *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 1610-1623.
- Conibear,E. and Stevens,T.H. (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1404**, 211-230.
- Conibear,E. and Stevens,T.H. (2000). Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 305-323.
- Couplan,E., Le Cann,M., Le Foll,C., Corporeau,C., Blondel,M., and Delarue,J. (2009). Polyunsaturated fatty acids inhibit PI3K activity in a yeast-based model system. *Biotechnol. J.*, **4**, 1190-1197.
- Craney,A., Ahmed,S., and Nodwell,J. (2013). Towards a new science of secondary metabolism. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **66**, 387-400.
- Cutler,N.S., Heitman,J., and Cardenas,M.E. (1997). STT4 is an essential phosphatidylinositol 4-kinase that is a target of wortmannin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27671-27677.
- Dalton,S. (2013). Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 241-246.
- Dan,H.C., Sun,M., Yang,L., Feldman,R.I., Sui,X.M., Ou,C.C., Nellist,M., Yeung,R.S., Halley,D.J., Nicosia,S.V., Pledger,W.J., and Cheng,J.Q. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35364-35370.
- Datta,S.R., Dudek,H., Tao,X., Masters,S., Fu,H., Gotoh,Y., and Greenberg,M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- Davies,M.A., Stemke-Hale,K., Tellez,C., Calderone,T.L., Deng,W., Prieto,V.G., Lazar,A.J., Gershenwald,J.E., and Mills,G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br. J. Cancer.*, **99**, 1265-1268.
- De Laurentiis,M., Arpino,G., Massarelli,E., Ruggiero,A., Carlomagno,C., Ciardiello,F., Tortora,G., D'Agostino,D., Caputo,F., Cancellò,G., Montagna,E., Malorni,L., Zinno,L., Lauria,R., Bianco,A.R., and De Placido,S. (2005). A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4741-4748.
- Delage,E., Puyaubert,J., Zachowski,A., and Ruelland,E. (2013). Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. *Prog. Lipid Res.*, **52**, 1-14.

- Delage,E., Ruelland,E., Zachowski,A., and Puyaubert,J. (2012). Eat in or take away? How phosphatidylinositol 4-kinases feed the phospholipase C pathway with substrate. *Plant Signal. Behav.*, **7**, 1197-1199.
- Delley,P.A. and Hall,M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell Biol.*, **147**, 163-174.
- Denis,V. and Cyert,M.S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell.*, **4**, 36-45.
- Desrivieres,S., Cooke,F.T., Parker,P.J., and Hall,M.N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15787-15793.
- Dhand,R., Hara,K., Hiles,I., Bax,B., Gout,I., Panayotou,G., Fry,M.J., Yonezawa,K., Kasuga,M., and Waterfield,M.D. (1994). PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *EMBO J.*, **13**, 511-521.
- Di Paolo,G. and De Camilli,P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.*, **443**, 651-657.
- Diehl,J.A., Cheng,M., Roussel,M.F., and Sherr,C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, **12**, 3499-3511.
- Dong,Y., Pruyne,D., and Bretscher,A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.*, **161**, 1081-1092.
- Duennwald,M.L., Jagadish,S., Muchowski,P.J., and Lindquist,S. (2006). Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 11045-11050.
- Dupres,V., Alsteens,D., Wilk,S., Hansen,B., Heinisch,J.J., and Dufrene,Y.F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 857-862.
- Eisenberg,T., Buttner,S., Kroemer,G., and Madeo,F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis.*, **12**, 1011-1023.
- Eitzen,G., Wang,L., Thorngren,N., and Wickner,W. (2002). Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J. Cell Biol.*, **158**, 669-679.
- Elden,A.C., Kim,H.J., Hart,M.P., Chen-Plotkin,A.S., Johnson,B.S., Fang,X., Armakola,M., Geser,F., Greene,R., Lu,M.M., Padmanabhan,A., Clay-Falcone,D., McCluskey,L., Elman,L., Juhr,D., Gruber,P.J., Rub,U., Auburger,G., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M., Van Deerlin,V.M., Bonini,N.M., and Gitler,A.D.

- (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature.*, **466**, 1069-1075.
- Ellis,M.J., Tao,Y., Young,O., White,S., Proia,A.D., Murray,J., Renshaw,L., Faratian,D., Thomas,J., Dowsett,M., Krause,A., Evans,D.B., Miller,W.R., and Dixon,J.M. (2006). Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 3019-3025.
 - Enserink,J.M. (2012). Chemical genetics: budding yeast as a platform for drug discovery and mapping of genetic pathways. *Molecules.*, **17**, 9258-9273.
 - Epp,N., Rethmeier,R., Kramer,L., and Ungermann,C. (2011). Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur. J. Cell Biol.*, **90**, 779-785.
 - Erdman,S., Lin,L., Malczynski,M., and Snyder,M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J. Cell Biol.*, **140**, 461-483.
 - Fabrizio,P., Hoon,S., Shamaldas,M., Galbani,A., Wei,M., Giaever,G., Nislow,C., and Longo,V.D. (2010). Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies vacuolar protein sorting, autophagy, biosynthetic, and tRNA methylation genes involved in life span regulation. *PLoS. Genet.*, **6**, e1001024.
 - Falasca,M. and Maffucci,T. (2007). Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 211-214.
 - Fan,Q.W., Knight,Z.A., Goldenberg,D.D., Yu,W., Mostov,K.E., Stokoe,D., Shokat,K.M., and Weiss,W.A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell.*, **9**, 341-349.
 - Farese,R.V., Sajan,M.P., and Standaert,M.L. (2005). Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)*, **230**, 593-605.
 - Fernandez-Pinar,P., Aleman,A., Sondek,J., Dohlman,H.G., Molina,M., and Martin,H. (2012). The Salmonella Typhimurium effector SteC inhibits Cdc42-mediated signaling through binding to the exchange factor Cdc24 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **23**, 4430-4443.
 - Ferrell,J.E., Jr. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 460-466.
 - Finger,F.P., Hughes,T.E., and Novick,P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell.*, **92**, 559-571.
 - Flanagan,C.A., Schnieders,E.A., Emerick,A.W., Kunisawa,R., Admon,A., and Thorner,J. (1993). Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science.*, **262**, 1444-1448.

- Folkes,A.J., Ahmadi,K., Alderton,W.K., Alix,S., Baker,S.J., Box,G., Chuckowree,I.S., Clarke,P.A., Depledge,P., Eccles,S.A., Friedman,L.S., Hayes,A., Hancox,T.C., Kugendradas,A., Lensun,L., Moore,P., Olivero,A.G., Pang,J., Patel,S., Pergl-Wilson,G.H., Raynaud,F.I., Robson,A., Saghir,N., Salphati,L., Sohal,S., Ultsch,M.H., Valenti,M., Wallweber,H.J., Wan,N.C., Wiesmann,C., Workman,P., Zhyvoloup,A., Zvelebil,M.J., and Shuttleworth,S.J. (2008). The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-t hieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.*, **51**, 5522-5532.
- Foti,M., Audhya,A., and Emr,S.D. (2001). Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 2396-2411.
- Foukas,L.C., Claret,M., Pearce,W., Okkenhaug,K., Meek,S., Peskett,E., Sancho,S., Smith,A.J., Withers,D.J., and Vanhaesebroeck,B. (2006). Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature.*, **441**, 366-370.
- Foury,F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene.*, **195**, 1-10.
- Franzusoff,A., Redding,K., Crosby,J., Fuller,R.S., and Schekman,R. (1991). Localization of components involved in protein transport and processing through the yeast Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, **112**, 27-37.
- Fuchikami,K., Togame,H., Sagara,A., Satoh,T., Gantner,F., Bacon,K.B., and Reinemer,P. (2002). A versatile high-throughput screen for inhibitors of lipid kinase activity: development of an immobilized phospholipid plate assay for phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Biomol. Screen.*, **7**, 441-450.
- Fujiwara,T., Tanaka,K., Mino,A., Kikyo,M., Takahashi,K., Shimizu,K., and Takai,Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 1221-1233.
- Furuta,N., Fujimura-Kamada,K., Saito,K., Yamamoto,T., and Tanaka,K. (2007). Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 295-312.
- Galan,J.M., Wiederkehr,A., Seol,J.H., Haguenaue-Tsapis,R., Deshaies,R.J., Riezman,H., and Peter,M. (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 3105-3117.
- Galletta,B.J., Mooren,O.L., and Cooper,J.A. (2010). Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**, 604-610.

- Gambardella,L. and Vermeren,S. (2013). Molecular players in neutrophil chemotaxis--focus on PI3K and small GTPases. *J. Leukoc. Biol.*
- Garcia,J.M., Silva,J., Pena,C., Garcia,V., Rodriguez,R., Cruz,M.A., Cantos,B., Provencio,M., Espana,P., and Bonilla,F. (2004a). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes. Cancer.*, **41**, 117-124.
- Garcia,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodriguez-Pena,J.M., Francois,J., Nombela,C., and Arroyo,J. (2004b). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 15183-15195.
- Garcia,R., Rodriguez-Pena,J.M., Bermejo,C., Nombela,C., and Arroyo,J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10901-10911.
- Garlich,J.R., De,P., Dey,N., Su,J.D., Peng,X., Miller,A., Murali,R., Lu,Y., Mills,G.B., Kundra,V., Shu,H.K., Peng,Q., and Durden,D.L. (2008). A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.*, **68**, 206-215.
- Garrenton,L.S., Stefan,C.J., McMurray,M.A., Emr,S.D., and Thorner,J. (2010). Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 11805-11810.
- Garrenton,L.S., Young,S.L., and Thorner,J. (2006). Function of the MAPK scaffold protein, Ste5, requires a cryptic PH domain. *Genes Dev.*, **20**, 1946-1958.
- Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 4241-4257.
- Geli,M.I. and Riezman,H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science.*, **272**, 533-535.
- Genilloud,O., Gonzalez,I., Salazar,O., Martin,J., Tormo,J.R., and Vicente,F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 375-389.
- Gerrard,S.R., Levi,B.P., and Stevens,T.H. (2000). Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic.*, **1**, 259-269.
- Ghigo,A., Damilano,F., Braccini,L., and Hirsch,E. (2010). PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays.*, **32**, 185-196.

- Giaever,G., Chu,A.M., Ni,L., Connelly,C., Riles,L., Veronneau,S., Dow,S., Lucau-Danila,A., Anderson,K., Andre,B., Arkin,A.P., Astromoff,A., El Bakkoury,M., Bangham,R., Benito,R., Brachat,S., Campanaro,S., Curtiss,M., Davis,K., Deutschbauer,A., Entian,K.D., Flaherty,P., Foury,F., Garfinkel,D.J., Gerstein,M., Gotte,D., Guldener,U., Hegemann,J.H., Hempel,S., Herman,Z., Jaramillo,D.F., Kelly,D.E., Kelly,S.L., Kotter,P., LaBonte,D., Lamb,D.C., Lan,N., Liang,H., Liao,H., Liu,L., Luo,C., Lussier,M., Mao,R., Menard,P., Ooi,S.L., Revuelta,J.L., Roberts,C.J., Rose,M., Ross-MacDonald,P., Scherens,B., Schimmack,G., Shafer,B., Shoemaker,D.D., Sookhai-Mahadeo,S., Storms,R.K., Strathern,J.N., Valle,G., Voet,M., Volckaert,G., Wang,C.Y., Ward,T.R., Wilhelmy,J., Winzeler,E.A., Yang,Y., Yen,G., Youngman,E., Yu,K., Bussey,H., Boeke,J.D., Snyder,M., Philippsen,P., Davis,R.W., and Johnston,M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.*, **418**, 387-391.
- Gietz,R.D. and Sugino,A. (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.*, **74**, 527-534.
- Gietz,R.D. and Woods,R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.*, **350:87-96.**, 87-96.
- Gloor,Y., Schone,M., Habermann,B., Ercan,E., Beck,M., Weselek,G., Muller-Reichert,T., and Walch-Solimena,C. (2010). Interaction between Sec7p and Pik1p: the first clue for the regulation of a coincidence detection signal. *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 575-583.
- Goel, A.,Arnold, CN.,Niedzwiecki D.,Carethers, JM.,Dowell, JM.,Wasserman, L.,Compton, C.,Mayer, RJ.,Bertagnolli, MM.,Boland, CR.(2004). Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* **64(9)**:3014-21
- Gray,J.V., Ogas,J.P., Kamada,Y., Stone,M., Levin,D.E., and Herskowitz,I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.*, **16**, 4924-4937.
- Gregory,M.A., Qi,Y., and Hann,S.R. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51606-51612.
- Grote,E., Carr,C.M., and Novick,P.J. (2000). Ordering the final events in yeast exocytosis. *J. Cell Biol.*, **151**, 439-452.
- Guillermet-Guibert,J., Bjorklof,K., Salpekar,A., Gonella,C., Ramadani,F., Bilancio,A., Meek,S., Smith,A.J., Okkenhaug,K., and Vanhaesebroeck,B. (2008). The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 8292-8297.

- Guo,W., Roth,D., Walch-Solimena,C., and Novick,P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.*, **18**, 1071-1080.
- Guo,W., Tamanoi,F., and Novick,P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 353-360.
- Gupta,S., Ramjaun,A.R., Haiko,P., Wang,Y., Warne,P.H., Nicke,B., Nye,E., Stamp,G., Alitalo,K., and Downward,J. (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell.*, **129**, 957-968.
- Ha,S.A., Torabinejad,J., DeWald,D.B., Wenk,M.R., Lucast,L., De Camilli,P., Newitt,R.A., Aebersold,R., and Nothwehr,S.F. (2003). The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 1319-1333.
- Hama,H., Schnieders,E.A., Thorner,J., Takemoto,J.Y., and DeWald,D.B. (1999). Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34294-34300.
- Hamel,L.P., Nicole,M.C., Duplessis,S., and Ellis,B.E. (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell.*, **24**, 1327-1351.
- Han,E.S., Wu,Y., McCarter,R., Nelson,J.F., Richardson,A., and Hilsenbeck,S.G. (2004). Reproducibility, sources of variability, pooling, and sample size: important considerations for the design of high-density oligonucleotide array experiments. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, 306-315.
- Han,G.S., Audhya,A., Markley,D.J., Emr,S.D., and Carman,G.M. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* LSB6 gene encodes phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47709-47718.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4), 557-80.
- Harlan,J.E., Hajduk,P.J., Yoon,H.S., and Fesik,S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature.*, **371**, 168-170.
- Hashimoto,H. and Yoda,K. (1997). Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 682-686.
- Hayakawa,M., Kaizawa,H., Moritomo,H., Koizumi,T., Ohishi,T., Okada,M., Ohta,M., Tsukamoto,S., Parker,P., Workman,P., and Waterfield,M. (2006a). Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6847-6858.

- Hayakawa,M., Kawaguchi,K., Kaizawa,H., Koizumi,T., Ohishi,T., Yamano,M., Okada,M., Ohta,M., Tsukamoto,S., Raynaud,F.I., Parker,P., Workman,P., and Waterfield,M.D. (2007). Synthesis and biological evaluation of sulfonylhydrazone-substituted imidazo[1,2-a]pyridines as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5837-5844.
- He,B. and Guo,W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 537-542.
- He,B., Xi,F., Zhang,X., Zhang,J., and Guo,W. (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J.*, **19**;26, 4053-4065.
- Helliwell,S.B., Schmidt,A., Ohya,Y., and Hall,M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.*, **8**, 1211-1214.
- Hemmings,B.A. and Restuccia,D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011189.
- Hicke,L., Zanolari,B., Pypaert,M., Rohrer,J., and Riezman,H. (1997). Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 13-31.
- Hillenmeyer,M.E., Ericson,E., Davis,R.W., Nislow,C., Koller,D., and Giaever,G. (2010). Systematic analysis of genome-wide fitness data in yeast reveals novel gene function and drug action. *Genome Biol.*, **11**, R30-11.
- Hillenmeyer,M.E., Fung,E., Wildenhain,J., Pierce,S.E., Hoon,S., Lee,W., Proctor,M., St Onge,R.P., Tyers,M., Koller,D., Altman,R.B., Davis,R.W., Nislow,C., and Giaever,G. (2008). The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science.*, **320**, 362-365.
- Hoeller,D., Volarevic,S., and Dikic,I. (2005). Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 107-111.
- Homma,K., Terui,S., Minemura,M., Qadota,H., Anraku,Y., Kanaho,Y., and Ohya,Y. (1998). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J. Biol. Chem.*, **19**;273, 15779-15786.
- Hoon,S., St Onge,R.P., Giaever,G., and Nislow,C. (2008). Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 499-504.
- Hosotani,T., Koyama,H., Uchino,M., Miyakawa,T., and Tsuchiya,E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells.*, **6**, 775-788.

- Hsu,S.C., TerBush,D., Abraham,M., and Guo,W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int. Rev. Cytol.*, **233:243-65.**, 243-265.
- Hu,Q., Klippel,A., Muslin,A.J., Fantl,W.J., and Williams,L.T. (1995). Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science.*, **268**, 100-102.
- Huang,C.H., Mandelker,D., Gabelli,S.B., and Amzel,L.M. (2008). Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle.*, **7**, 1151-1156.
- Huang,C.Y. and Ferrell,J.E., Jr. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 10078-10083.
- Hughes,W.E., Cooke,F.T., and Parker,P.J. (2000). Sac phosphatase domain proteins. *Biochem. J.*, **350 Pt 2:337-52.**, 337-352.
- Huynh,J., Kwa,M.Q., Cook,A.D., Hamilton,J.A., and Scholz,G.M. (2012). CSF-1 receptor signalling from endosomes mediates the sustained activation of Erk1/2 and Akt in macrophages. *Cell Signal.*, **24**, 1753-1761.
- Inoki,K., Li,Y., Zhu,T., Wu,J., and Guan,K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 648-657.
- Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., and Oshima,Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 3076-3083.
- Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- Itoh,T. and De Camilli,P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1761**, 897-912.
- Jacinto,E. and Lorberg,A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.*, **410**, 19-37.
- Jaiswal,B.S., Janakiraman,V., Kljavin,N.M., Chaudhuri,S., Stern,H.M., Wang,W., Kan,Z., Dbouk,H.A., Peters,B.A., Waring,P., Dela,V.T., Kenski,D.M., Bowman,K.K., Lorenzo,M., Li,H., Wu,J., Modrusan,Z., Stinson,J., Eby,M., Yue,P., Kaminker,J.S., de Sauvage,F.J., Backer,J.M., and Seshagiri,S. (2009). Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell.*, **16**, 463-474.
- Jedd,G., Mulholland,J., and Segev,N. (1997). Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *J. Cell Biol.*, **137**, 563-580.

- Jendretzki,A., Wittland,J., Wilk,S., Straede,A., and Heinisch,J.J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.*, **90**, 740-744.
- Jia,S., Liu,Z., Zhang,S., Liu,P., Zhang,L., Lee,S.H., Zhang,J., Signoretti,S., Loda,M., Roberts,T.M., and Zhao,J.J. (2008). Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature.*, **454**, 776-779.
- Jimenez,J., Cid,V.J., Cenamor,R., Yuste,M., Molero,G., Nombela,C., and Sanchez,M. (1998). Morphogenesis beyond cytokinetic arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **143**, 1617-1634.
- Johnson,B.S., McCaffery,J.M., Lindquist,S., and Gitler,A.D. (2008). A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 6439-6444.
- Johnson,C.M., Chichili,G.R., and Rodgers,W. (2008b). Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **283**, 29920-29928.
- Johnson,C.M. and Rodgers,W. (2008a). Spatial Segregation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP(2)) Signaling in Immune Cell Functions. *Immunol. Endocr. Metab Agents Med. Chem.*, **8**, 349-357.
- Johnson,J.M., Jin,M., and Lew,D.J. (2011). Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 740-746.
- Jucker,M., Sudel,K., Horn,S., Sickel,M., Wegner,W., Fiedler,W., and Feldman,R.A. (2002). Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia.*, **16**, 894-901.
- Jung,U.S. and Levin,D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.*, **34**, 1049-1057.
- Kaksonen,M., Toret,C.P., and Drubin,D.G. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 404-414.
- Kamada,Y., Qadota,H., Python,C.P., Anraku,Y., Ohya,Y., and Levin,D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9193-9196.
- Kang,S., Bader,A.G., and Vogt,P.K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 802-807.

- Kang,S., Denley,A., Vanhaesebroeck,B., and Vogt,P.K. (2006). Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 1289-1294.
- Ketela,T., Green,R., and Bussey,H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.*, **181**, 3330-3340.
- Keune,W., Bultsma,Y., Sommer,L., Jones,D., and Divecha,N. (2011). Phosphoinositide signalling in the nucleus. *Adv. Enzyme Regul.*, **51**, 91-99.
- Khalfan,W., Ivanovska,I., and Rose,M.D. (2000). Functional interaction between the PKC1 pathway and CDC31 network of SPB duplication genes. *Genetics.*, **155**, 1543-1559.
- Kim,K.Y., Truman,A.W., and Levin,D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2579-2589.
- Klippel,A., Reinhard,C., Kavanaugh,W.M., Apell,G., Escobedo,M.A., and Williams,L.T. (1996). Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4117-4127.
- Knight,Z.A., Gonzalez,B., Feldman,M.E., Zunder,E.R., Goldenberg,D.D., Williams,O., Loewith,R., Stokoe,D., Balla,A., Toth,B., Balla,T., Weiss,W.A., Williams,R.L., and Shokat,K.M. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell.*, **125**, 733-747.
- Knight,Z.A. and Shokat,K.M. (2005). Features of selective kinase inhibitors. *Chem. Biol.*, **12**, 621-637.
- Kodaki,T., Woscholski,R., Hallberg,B., Rodriguez-Viciano,P., Downward,J., and Parker,P.J. (1994). The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr. Biol.*, **4**, 798-806.
- Kohno,H., Tanaka,K., Mino,A., Umikawa,M., Imamura,H., Fujiwara,T., Fujita,Y., Hotta,K., Qadota,H., Watanabe,T., Ohya,Y., and Takai,Y. (1996). Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**, 6060-6068.
- Kolaczowski,M., Kolaczowska,A., Luczynski,J., Witek,S., and Goffeau,A. (1998). In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.*, **4**, 143-158.
- Kondapaka,S.B., Singh,S.S., Dasmahapatra,G.P., Sausville,E.A., and Roy,K.K. (2003). Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 1093-1103.

- Kong,D. and Yamori,T. (2007). ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms. *Cancer Sci.*, **98**, 1638-1642.
- Krobitsch,S. and Lindquist,S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1589-1594.
- Krohn,A., Diedler,T., Burkhardt,L., Mayer,P.S., De Silva,C., Meyer-Kornblum,M., Kotschau,D., Tennstedt,P., Huang,J., Gerhauser,C., Mader,M., Kurtz,S., Sirma,H., Saad,F., Steuber,T., Graefen,M., Plass,C., Sauter,G., Simon,R., Minner,S., and Schlomm,T. (2012). Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am. J. Pathol.*, **181**, 401-412.
- Ktori,C., Shepherd,P.R., and O'Rourke,L. (2003). TNF-alpha and leptin activate the alpha-isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20;306**, 139-143.
- Kubler,E. and Riezman,H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.*, **12**, 2855-2862.
- Kummel,A., Gubler,H., Gehin,P., Beibel,M., Gabriel,D., and Parker,C.N. (2010). Integration of multiple readouts into the z' factor for assay quality assessment. *J. Biomol. Screen.*, **15**, 95-101.
- Kurosu,H., Maehama,T., Okada,T., Yamamoto,T., Hoshino,S., Fukui,Y., Ui,M., Hazeki,O., and Katada,T. (1997). Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24252-24256.
- Kurtz,J.E. and Ray-Coquard,I. (2012). PI3 kinase inhibitors in the clinic: an update. *Anticancer Res.*, **32**, 2463-2470.
- Kutateladze,T.G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 507-513.
- Lachmann,J., Barr,F.A., and Ungermann,C. (2012). The Msb3/Gyp3 GAP controls the activity of the Rab GTPases Vps21 and Ypt7 at endosomes and vacuoles. *Mol. Biol. Cell.*, **23**, 2516-2526.
- Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J., Hoheisel,J.D., and Francois,J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20345-20357.
- Lanoix,J., Ouwendijk,J., Lin,C.C., Stark,A., Love,H.D., Ostermann,J., and Nilsson,T. (1999). GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *EMBO J.*, **18**, 4935-4948.

- Lassing,I. and Lindberg,U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.*, **314**, 472-474.
- Lassing,I. and Lindberg,U. (1988). Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. *J. Cell Biochem.*, **37**, 255-267.
- Laux,T., Fukami,K., Thelen,M., Golub,T., Frey,D., and Caroni,P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.*, **149**, 1455-1472.
- Lazar,T., Gotte,M., and Gallwitz,D. (1997). Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 468-472.
- Lee,K.S. and Levin,D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 172-182.
- Lee,S.H., Poulogiannis,G., Pyne,S., Jia,S., Zou,L., Signoretti,S., Loda,M., Cantley,L.C., and Roberts,T.M. (2010). A constitutively activated form of the p110beta isoform of PI3-kinase induces prostatic intraepithelial neoplasia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 11002-11007.
- Lemmon,M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 99-111.
- Lemmon,S.K. and Traub,L.M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 457-466.
- Lempiainen,H. and Halazonetis,T.D. (2009). Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J.*, **28**, 3067-3073.
- Levin,D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.*, **189**, 1145-1175.
- Levin,D.E., Fields,F.O., Kunisawa,R., Bishop,J.M., and Thorner,J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell.*, **62**, 213-224.
- Lewis,M.J., Nichols,B.J., Prescianotto-Baschong,C., Riezman,H., and Pelham,H.R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 23-38.
- Li,Y., Moir,R.D., Sethy-Coraci,I.K., Warner,J.R., and Willis,I.M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 3843-3851.
- Lindsley,C.W., Barnett,S.F., Yaroschak,M., Bilodeau,M.T., and Layton,M.E. (2007). Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 1349-1363.

- Lindsley,C.W., Zhao,Z., Leister,W.H., Robinson,R.G., Barnett,S.F., Defeo-Jones,D., Jones,R.E., Hartman,G.D., Huff,J.R., Huber,H.E., and Duggan,M.E. (2005). Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 761-764.
- Link,W., Oyarzabal,J., Serelde,B.G., Albarran,M.I., Rabal,O., Cebria,A., Alfonso,P., Fominaya,J., Renner,O., Peregrina,S., Soilan,D., Ceballos,P.A., Hernandez,A.I., Lorenzo,M., Pevarello,P., Granda,T.G., Kurz,G., Carnero,A., and Bischoff,J.R. (2009). Chemical interrogation of FOXO3a nuclear translocation identifies potent and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinases. *J. Biol. Chem.*, **284**, 28392-28400.
- Lipatova,Z., Tokarev,A.A., Jin,Y., Mulholland,J., Weisman,L.S., and Segev,N. (2008). Direct interaction between a myosin V motor and the Rab GTPases Ypt31/32 is required for polarized secretion. *Mol. Biol. Cell.*, **19**, 4177-4187.
- Lipschutz,J.H. and Mostov,K.E. (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr. Biol.*, **12**, R212-R214.
- Liu,H., Krizek,J., and Bretscher,A. (1992). Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics.*, **132**, 665-673.
- Liu,J. and Guo,W. (2012a). The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma.*, **249**, 587-597.
- Liu,S. and Storrie,B. (2012b). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol. Life Sci.*, **69**, 4093-4106.
- Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.*, **25**, 402-408.
- Longo,V.D., Ellerby,L.M., Bredesen,D.E., Valentine,J.S., and Gralla,E.B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.*, **137**, 1581-1588.
- Lopez,L.C., Dos-Reis,S., Espargaro,A., Carrodegua,J.A., Maddelein,M.L., Ventura,S., and Sancho,J. (2012). Discovery of novel inhibitors of amyloid beta-peptide 1-42 aggregation. *J. Med. Chem.*, **55**, 9521-9530.
- Lorberg,A., Jacoby,J.J., Schmitz,H.P., and Heinisch,J.J. (2001). The PH domain of the yeast GEF Rom2p serves an essential function in vivo. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 505-513.
- Luo,J. and Cantley,L.C. (2005). The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and it's implication in cancer. *Cell Cycle.*, **4**, 1309-1312.

- Madden,K., Sheu,Y.J., Baetz,K., Andrews,B., and Snyder,M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science.*, **275**, 1781-1784.
- Maehama,T. and Dixon,J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13375-13378.
- Maehama,T., Taylor,G.S., and Dixon,J.E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, **70:247-79.**, 247-279.
- Mager,W.H. and Winderickx,J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 265-273.
- Maier,U., Babich,A., and Nurnberg,B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29311-29317.
- Maira,S.M., Pecchi,S., Huang,A., Burger,M., Knapp,M., Sterker,D., Schnell,C., Guthy,D., Nagel,T., Wiesmann,M., Brachmann,S., Fritsch,C., Dorsch,M., Chene,P., Shoemaker,K., De Pover,A., Menezes,D., Martiny-Baron,G., Fabbro,D., Wilson,C.J., Schlegel,R., Hofmann,F., Garcia-Echeverria,C., Sellers,W.R., and Voliva,C.F. (2012). Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 317-328.
- Maira,S.M., Stauffer,F., Brueggen,J., Furet,P., Schnell,C., Fritsch,C., Brachmann,S., Chene,P., De Pover,A., Schoemaker,K., Fabbro,D., Gabriel,D., Simonen,M., Murphy,L., Finan,P., Sellers,W., and Garcia-Echeverria,C. (2008). Identification and characterization of NVP-BE2235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 1851-1863.
- Mammoto,A., Ohtsuka,T., Hotta,I., Sasaki,T., and Takai,Y. (1999). Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25517-25524.
- Manandhar,S.P., Hildebrandt,E.R., Jacobsen,W.H., Santangelo,G.M., and Schmidt,W.K. (2010). Chemical inhibition of CaaX protease activity disrupts yeast Ras localization. *Yeast.*, **27**, 327-343.
- Marin,M.J., Flandez,M., Bermejo,C., Arroyo,J., Martin,H., and Molina,M. (2009). Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol. Genet. Genomics.*, **281**, 345-359.
- Marone,R., Cmiljanovic,V., Giese,B., and Wymann,M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1784**, 159-185.

- Martelli,A.M., Tabellini,G., Bressanin,D., Ognibene,A., Goto,K., Cocco,L., and Evangelisti,C. (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1823**, 2168-2178.
- Martin,H., Arroyo,J., Sanchez,M., Molina,M., and Nombela,C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slr2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 177-184.
- Martin,H., Flandez,M., Nombela,C., and Molina,M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.*, **58**, 6-16.
- Martin-Belmonte,F. and Mostov,K. (2007). Phosphoinositides control epithelial development. *Cell Cycle.*, **6**, 1957-1961.
- Martini,M., Ciruolo,E., Gulluni,F., and Hirsch,E. (2013). Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Front Oncol.*, **3**:108, 108.
- Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., and Ota,I.M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7651-7660.
- Mayer,A., Scheglmann,D., Dove,S., Glatz,A., Wickner,W., and Haas,A. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 807-817.
- Mayinger,P. (2012). Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1821**, 1104-1113.
- Mazur,P. and Baginsky,W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14604-14609.
- McCrea,H.J. and De Camilli,P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology. (Bethesda.)*, **24:8-16**, 8-16.
- McCubrey,J.A., Steelman,L.S., Chappell,W.H., Abrams,S.L., Montalto,G., Cervello,M., Nicoletti,F., Fagone,P., Malaponte,G., Mazzarino,M.C., Candido,S., Libra,M., Basecke,J., Mijatovic,S., Maksimovic-Ivanic,D., Milella,M., Tafuri,A., Cocco,L., Evangelisti,C., Chiarini,F., and Martelli,A.M. (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget.*, **3**, 954-987.
- McLaughlin,S. and Murray,D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature.*, **438**, 605-611.
- Melese,T. and Hieter,P. (2002). From genetics and genomics to drug discovery: yeast rises to the challenge. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 544-547.

- Meriin,A.B., Zhang,X., He,X., Newnam,G.P., Chernoff,Y.O., and Sherman,M.Y. (2002). Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.*, **157**, 997-1004.
- Metjian,A., Roll,R.L., Ma,A.D., and Abrams,C.S. (1999). Agonists cause nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A Gbetagamma-dependent pathway that requires the p110gamma amino terminus. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27943-27947.
- Miaczynska,M., Pelkmans,L., and Zerial,M. (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 400-406.
- Miled,N., Yan,Y., Hon,W.C., Perisic,O., Zvelebil,M., Inbar,Y., Schneidman-Duhovny,D., Wolfson,H.J., Backer,J.M., and Williams,R.L. (2007). Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science.*, **317**, 239-242.
- Mita,M.M., Mita,A., and Rowinsky,E.K. (2003). The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol. Ther.*, **2**, S169-S177.
- Mizuno-Yamasaki,E., Rivera-Molina,F., and Novick,P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.*, **81**:637-59., 637-659.
- Molina,M., Cid,V.J., and Martin,H. (2010). Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast.*, **27**, 503-511.
- Morales-Johansson,H., Jenoe,P., Cooke,F.T., and Hall,M.N. (2004). Negative regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by the INP51-associated proteins TAX4 and IRS4. *J. Biol. Chem.*, **279**, 39604-39610.
- Moravcevic,K., Oxley,C.L., and Lemmon,M.A. (2012). Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure.*, **20**, 15-27.
- Muchowski,P.J., Schaffar,G., Sittler,A., Wanker,E.E., Hayer-Hartl,M.K., and Hartl,F.U. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 7841-7846.
- Mulet,J.M., Martin,D.E., Loewith,R., and Hall,M.N. (2006). Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.*, **281**, 33000-33007.
- Myers,M.B., Wang,Y., McKim,K.L., and Parsons,B.L. (2012). Hotspot oncomutations: implications for personalized cancer treatment. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, **12**, 603-620.
- Nakaya,S., Mizuno,S., Ishigami,H., Yamakawa,Y., Kawagishi,H., and Ushimaru,T. (2012). New rapid screening method for anti-aging compounds using budding

- yeast and identification of beauveriolide I as a potent active compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1226-1228.
- Nanduri,J., Mitra,S., Andrei,C., Liu,Y., Yu,Y., Hitomi,M., and Tartakoff,A.M. (1999). An unexpected link between the secretory path and the organization of the nucleus. *J. Biol. Chem.*, **%19;274**, 33785-33789.
 - Ndubaku,C.O., Heffron,T.P., Staben,S.T., Baumgardner,M., Blaquiere,N., Bradley,E., Bull,R., Do,S., Dotson,J., Dudley,D., Edgar,K.A., Friedman,L.S., Goldsmith,R., Heald,R.A., Kolesnikov,A., Lee,L., Lewis,C., Nannini,M., Nonomiya,J., Pang,J., Price,S., Prior,W.W., Salphati,L., Sideris,S., Wallin,J.J., Wang,L., Wei,B., Sampath,D., and Olivero,A.G. (2013). Discovery of 2-{3-[2-(1-Isopropyl-3-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanamide (GDC-0032): A beta-Sparing Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor with High Unbound Exposure and Robust in Vivo Antitumor Activity. *J. Med. Chem.*.
 - Nickel,W., Malsam,J., Gorgas,K., Ravazzola,M., Jenne,N., Helms,J.B., and Wieland,F.T. (1998). Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J. Cell Sci.*, **111**, 3081-3090.
 - Nickerson,D.P., Brett,C.L., and Merz,A.J. (2009). Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 543-551.
 - Nierras,C.R. and Warner,J.R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13235-13241.
 - Nogales-Cadenas,R., Carmona-Saez,P., Vazquez,M., Vicente,C., Yang,X., Tirado,F., Carazo,J.M., and Pascual-Montano,A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.*, **37**, W317-W322.
 - Okada,K., Ravi,H., Smith,E.M., and Goode,B.L. (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol. Biol. Cell.*, **17**, 2855-2868.
 - Ono,T., Suzuki,T., Anraku,Y., and Iida,H. (1994). The MID2 gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca(2+)-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.*, **151**, 203-208.
 - Ooms,L.M., McColl,B.K., Wiradjaja,F., Wijayaratnam,A.P., Gleeson,P., Gething,M.J., Sambrook,J., and Mitchell,C.A. (2000). The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatases inp52p and inp53p translocate to actin patches following hyperosmotic stress: mechanism for regulating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate at plasma membrane invaginations. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 9376-9390.

- Orlando,K., Zhang,J., Zhang,X., Yue,P., Chiang,T., Bi,E., and Guo,W. (2008). Regulation of Gic2 localization and function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate during the establishment of cell polarity in budding yeast. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14205-14212.
- Orlean,P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics.*, **192**, 775-818.
- Orloff,M.S. and Eng,C. (2008). Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene.*, **27**, 5387-5397.
- Ortiz,D., Medkova,M., Walch-Solimena,C., and Novick,P. (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J. Cell Biol.*, **157**, 1005-1015.
- Ortiz,D. and Novick,P.J. (2006). Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 107-116.
- Osborn,M.J. and Miller,J.R. (2007). Rescuing yeast mutants with human genes. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, **6**, 104-111.
- Outeiro,T.F. and Giorgini,F. (2006). Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnol. J.*, **1**, 258-269.
- Outeiro,T.F. and Lindquist,S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science.*, **302**, 1772-1775.
- Ozaki,K., Tanaka,K., Imamura,H., Hihara,T., Kameyama,T., Nonaka,H., Hirano,H., Matsuura,Y., and Takai,Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**, 2196-2207.
- Parish,C.A., de la,C.M., Smith,S.K., Zink,D., Baxter,J., Tucker-Samaras,S., Collado,J., Platas,G., Bills,G., Diez,M.T., Vicente,F., Pelaez,F., and Wilson,K. (2009). Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted cis-decalin from *Geomyces pannorum*. *J. Nat. Prod.*, **72**, 59-62.
- Park,H.O. and Bi,E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 48-96.
- Parsons,A.B., Brost,R.L., Ding,H., Li,Z., Zhang,C., Sheikh,B., Brown,G.W., Kane,P.M., Hughes,T.R., and Boone,C. (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 62-69.
- Parsons,D.W., Wang,T.L., Samuels,Y., Bardelli,A., Cummins,J.M., DeLong,L., Silliman,N., Ptak,J., Szabo,S., Willson,J.K., Markowitz,S., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Lengauer,C., and Velculescu,V.E. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature.*, **436**, 792.

- Peplowska,K., Markgraf,D.F., Ostrowicz,C.W., Bange,G., and Ungermann,C. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev. Cell.*, **12**, 739-750.
- Perez,P. and Rincon,S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.*, **426**, 243-253.
- Perez-Tenorio,G., Alkhori,L., Olsson,B., Waltersson,M.A., Nordenskjold,B., Rutqvist,L.E., Skoog,L., and Stal,O. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 3577-3584.
- Perkins,E., Sun,D., Nguyen,A., Tulac,S., Francesco,M., Tavana,H., Nguyen,H., Tugendreich,S., Barthmaier,P., Couto,J., Yeh,E., Thode,S., Jarnagin,K., Jain,A., Morgans,D., and Melese,T. (2001). Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. *Cancer Res.*, **61**, 4175-4183.
- Philip,B. and Levin,D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 271-280.
- Piao,H.L., Machado,I.M., and Payne,G.S. (2007). NPFxD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 57-65.
- Pleiss,J.A., Whitworth,G.B., Bergkessel,M., and Guthrie,C. (2007). Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol. Cell.*, **27**, 928-937.
- Polo,S. and Di Fiore,P.P. (2006). Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell.*, **124**, 897-900.
- Poon,P.P., Nothwehr,S.F., Singer,R.A., and Johnston,G.C. (2001). The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. *J. Cell Biol.*, **155**, 1239-1250.
- Potter,C.J., Pedraza,L.G., and Xu,T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 658-665.
- Prasad,R. and Goffeau,A. (2012). Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, **66:39-63**, 39-63.
- Prescianotto-Baschong,C. and Riezman,H. (2002). Ordering of compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic.*, **3**, 37-49.
- Prosser,D.C., Drivas,T.G., Maldonado-Baez,L., and Wendland,B. (2011). Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J. Cell Biol.*, **195**, 657-671.

- Pruyne,D. and Bretscher,A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.*, **113**, 571-585.
- Qadota,H., Python,C.P., Inoue,S.B., Arisawa,M., Anraku,Y., Zheng,Y., Watanabe,T., Levin,D.E., and Ohya,Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.*, **272**, 279-281.
- Quenneville,N.R., Chao,T.Y., McCaffery,J.M., and Conibear,E. (2006). Domains within the GARP subunit Vps54 confer separate functions in complex assembly and early endosome recognition. *Mol. Biol. Cell.*, **17**, 1859-1870.
- Ramer,S.W., Elledge,S.J., and Davis,R.W. (1992). Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 11589-11593.
- Randazzo,P.A. and Kahn,R.A. (1994). GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein and acid phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10758-10763.
- Raymond,C.K., Howald-Stevenson,I., Vater,C.A., and Stevens,T.H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 1389-1402.
- Raynaud,F.I., Eccles,S., Clarke,P.A., Hayes,A., Nutley,B., Alix,S., Henley,A., Di Stefano,F., Ahmad,Z., Guillard,S., Bjerke,L.M., Kelland,L., Valenti,M., Patterson,L., Gowan,S., de Haven,B.A., Hayakawa,M., Kaizawa,H., Koizumi,T., Ohishi,T., Patel,S., Saghir,N., Parker,P., Waterfield,M., and Workman,P. (2007). Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer Res.*, **67**, 5840-5850.
- Resende,F.A., de Oliveira,A.P., de Camargo,M.S., Vilegas,W., and Varanda,E.A. (2013). Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. *PLoS. One.*, **8**, e74881.
- Roberts,C.J., Nelson,B., Marton,M.J., Stoughton,R., Meyer,M.R., Bennett,H.A., He,Y.D., Dai,H., Walker,W.L., Hughes,T.R., Tyers,M., Boone,C., and Friend,S.H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science.*, **287**, 873-880.
- Robertson,A.S., Smythe,E., and Ayscough,K.R. (2009). Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**, 2049-2065.
- Robinson,M., Poon,P.P., Schindler,C., Murray,L.E., Kama,R., Gabriely,G., Singer,R.A., Spang,A., Johnston,G.C., and Gerst,J.E. (2006). The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **17**, 1845-1858.

- Rodríguez-Escudero,I., Andres-Pons,A., Pulido,R., Molina,M., and Cid,V.J. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of mammalian protein kinase B/Akt in *Saccharomyces cerevisiae*, an in vivo model for the functional study of Akt mutations. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13373-13383.
- Rodríguez-Escudero,I., Ferrer,N.L., Rotger,R., Cid,V.J., and Molina,M. (2011a). Interaction of the Salmonella Typhimurium effector protein SopB with host cell Cdc42 is involved in intracellular replication. *Mol. Microbiol.*, **80**, 1220-1240.
- Rodríguez-Escudero,I., Oliver,M.D., Andres-Pons,A., Molina,M., Cid,V.J., and Pulido,R. (2011b). A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4132-4142.
- Rodríguez-Escudero,I., Roelants,F.M., Thorner,J., Nombela,C., Molina,M., and Cid,V.J. (2005). Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem. J.*, **390**, 613-623.
- Rodríguez-Escudero,I., Rotger,R., Cid,V.J., and Molina,M. (2006). Inhibition of Cdc42-dependent signalling in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphatase-dead SigD/SopB from Salmonella typhimurium. *Microbiology.*, **152**, 3437-3452.
- Rodríguez-Pena,J.M., Díez-Muniz,S., Nombela,C., and Arroyo,J. (2008). A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents. *J. Biotechnol.*, **133**, 311-317.
- Rodríguez-Viciana,P., Warne,P.H., Vanhaesebroeck,B., Waterfield,M.D., and Downward,J. (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.*, **15**, 2442-2451.
- Rohacs,T. (2009). Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell Calcium.*, **45**, 554-565.
- Rohatgi,R., Ho,H.Y., and Kirschner,M.W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.*, **150**, 1299-1310.
- Roumanie,O., Weinachter,C., Larrieu,I., Crouzet,M., and Doignon,F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **506**, 149-156.
- Rozelle,A.L., Machesky,L.M., Yamamoto,M., Driessens,M.H., Insall,R.H., Roth,M.G., Luby-Phelps,K., Marriott,G., Hall,A., and Yin,H.L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr. Biol.*, **10**, 311-320.
- Ruocco,K.M., Goncharova,E.I., Young,M.R., Colburn,N.H., McMahon,J.B., and Henrich,C.J. (2007). A high-throughput cell-based assay to identify specific inhibitors of transcription factor AP-1. *J. Biomol. Screen.*, **12**, 133-139.

- Saarikangas,J., Zhao,H., and Lappalainen,P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev.*, **90**, 259-289.
- Sadowski,L., Pilecka,I., and Miaczynska,M. (2009). Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp. Cell Res.*, **315**, 1601-1609.
- Saeed,A.I., Bhagabati,N.K., Braisted,J.C., Liang,W., Sharov,V., Howe,E.A., Li,J., Thiagarajan,M., White,J.A., and Quackenbush,J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.*, **411:134-93.**, 134-193.
- Saeed,A.I., Sharov,V., White,J., Li,J., Liang,W., Bhagabati,N., Braisted,J., Klapa,M., Currier,T., Thiagarajan,M., Sturn,A., Snuffin,M., Rezantsev,A., Popov,D., Ryltsov,A., Kostukovich,E., Borisovsky,I., Liu,Z., Vinsavich,A., Trush,V., and Quackenbush,J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.*, **34**, 374-378.
- Saijo,K., Katoh,T., Shimodaira,H., Oda,A., Takahashi,O., and Ishioka,C. (2012). Romidepsin (FK228) and its analogs directly inhibit phosphatidylinositol 3-kinase activity and potently induce apoptosis as histone deacetylase/phosphatidylinositol 3-kinase dual inhibitors. *Cancer Sci.*, **103**, 1994-2001.
- Sakane,H., Yamamoto,T., and Tanaka,K. (2006). The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN. *Cell Struct. Funct.*, **31**, 87-108.
- Salcedo-Sora,J.E., Ward,S.A., and Biagini,G.A. (2012). A yeast expression system for functional and pharmacological studies of the malaria parasite Ca(2)(+)/H(+) antiporter. *Malar. J.*, **11:254**, 254-11.
- Salphati,L., Pang,J., Plise,E.G., Chou,B., Halladay,J.S., Olivero,A.G., Rudewicz,P.J., Tian,Q., Wong,S., and Zhang,X. (2011). Preclinical pharmacokinetics of the novel PI3K inhibitor GDC-0941 and prediction of its pharmacokinetics and efficacy in human. *Xenobiotica.*, **41**, 1088-1099.
- Samuels,Y., Wang,Z., Bardelli,A., Silliman,N., Ptak,J., Szabo,S., Yan,H., Gazdar,A., Powell,S.M., Riggins,G.J., Willson,J.K., Markowitz,S., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., and Velculescu,V.E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.*, **304**, 554.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatics, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.
- Santiago-Tirado,F.H. and Bretscher,A. (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.*, **21**, 515-525.

- Sarbassov,D.D., Guertin,D.A., Ali,S.M., and Sabatini,D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.*, **307**, 1098-1101.
- Sata,M., Donaldson,J.G., Moss,J., and Vaughan,M. (1998). Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4204-4208.
- Sato,T.K., Rehling,P., Peterson,M.R., and Emr,S.D. (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol. Cell.*, **6**, 661-671.
- Schandel,K.A. and Jenness,D.D. (1994). Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 7245-7255.
- Scheeff,E.D. and Bourne,P.E. (2005). Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS. Comput. Biol.*, **1**, e49.
- Scherens,B. and Goffeau,A. (2004). The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.*, **5**, 229.
- Schill,N.J. and Anderson,R.A. (2009). Out, in and back again: PtdIns(4,5)P(2) regulates cadherin trafficking in epithelial morphogenesis. *Biochem. J.*, **418**, 247-260.
- Schmelzle,T., Helliwell,S.B., and Hall,M.N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 1329-1339.
- Schmidt,A., Bickle,M., Beck,T., and Hall,M.N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell.*, **88**, 531-542.
- Schmidt,A., Schmelzle,T., and Hall,M.N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1433-1441.
- Schonteich,E., Wilson,G.M., Burden,J., Hopkins,C.R., Anderson,K., Goldenring,J.R., and Prekeris,R. (2008). The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *J. Cell Sci.*, **121**, 3824-3833.
- Schultze,S.M., Hemmings,B.A., Niessen,M., and Tschopp,O. (2012). PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert. Rev. Mol. Med.*, **14**, e1.
- Seeley,E.S., Kato,M., Margolis,N., Wickner,W., and Eitzen,G. (2002). Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 782-794.

- Sengupta,D. and Linstedt,A.D. (2011). Control of organelle size: the Golgi complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27:57-77.**, 57-77.
- Serra,V., Markman,B., Scaltriti,M., Eichhorn,P.J., Valero,V., Guzman,M., Botero,M.L., Llonch,E., Atzori,F., Di Cosimo,S., Maira,M., Garcia-Echeverria,C., Parra,J.L., Arribas,J., and Baselga,J. (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res.*, **68**, 8022-8030.
- Shaw,J.D., Cummings,K.B., Huyer,G., Michaelis,S., and Wendland,B. (2001). Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp. Cell Res.*, **271**, 1-9.
- Shaw,M., Cohen,P., and Alessi,D.R. (1997). Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.*, **416**, 307-311.
- Shayesteh,L., Lu,Y., Kuo,W.L., Baldocchi,R., Godfrey,T., Collins,C., Pinkel,D., Powell,B., Mills,G.B., and Gray,J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.*, **21**, 99-102.
- Shewan,A., Eastburn,D.J., and Mostov,K. (2011). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a004796.
- Shi,Y., Paluch,B.E., Wang,X., and Jiang,X. (2012). PTEN at a glance. *J. Cell Sci.*, **125**, 4687-4692.
- Shin,I., Yakes,F.M., Rojo,F., Shin,N.Y., Bakin,A.V., Baselga,J., and Arteaga,C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.*, **8**, 1145-1152.
- Shuttleworth,S.J., Silva,F.A., Cecil,A.R., Tomassi,C.D., Hill,T.J., Raynaud,F.I., Clarke,P.A., and Workman,P. (2011). Progress in the preclinical discovery and clinical development of class I and dual class I/IV phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **18**, 2686-2714.
- Siggers,K.A. and Lesser,C.F. (2008). The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host. Microbe.*, **4**, 8-15.
- Sikorski,R.S. and Hieter,P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **122**, 19-27.
- Silva,R.D., Manon,S., Goncalves,J., Saraiva,L., and Corte-Real,M. (2011). The importance of humanized yeast to better understand the role of bcl-2 family in apoptosis: finding of novel therapeutic opportunities. *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 246-255.

- Singer-Kruger,B., Frank,R., Crausaz,F., and Riezman,H. (1993). Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14376-14386.
- Singer-Kruger,B., Stenmark,H., Dusterhoft,A., Philippsen,P., Yoo,J.S., Gallwitz,D., and Zerial,M. (1994). Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J. Cell Biol.*, **125**, 283-298.
- Singer-Kruger,B., Stenmark,H., and Zerial,M. (1995). Yeast Ypt51p and mammalian Rab5: counterparts with similar function in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.*, **108**, 3509-3521.
- Singh,B., Ittmann,M.M., and Krolewski,J.J. (1998). Sporadic breast cancers exhibit loss of heterozygosity on chromosome segment 10q23 close to the Cowden disease locus. *Genes Chromosomes. Cancer.*, **21**, 166-171.
- Siniosoglou,S. and Pelham,H.R. (2001). An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *EMBO J.*, **20**, 5991-5998.
- Slaughter,B.D., Smith,S.E., and Li,R. (2009). Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a003384.
- Smaczynska-de Rooij,I.I., Costa,R., and Ayscough,K.R. (2008). Yeast Arf3p modulates plasma membrane PtdIns(4,5)P2 levels to facilitate endocytosis. *Traffic.*, **9**, 559-573.
- Soler,M., Plovins,A., Martín,H., Molina,M., Nombela,C..(1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol.*, **5**, 833-42.
- Srinivasan,S., Seaman,M., Nemoto,Y., Daniell,L., Suchy,S.F., Emr,S., De Camilli,P., and Nussbaum,R. (1997). Disruption of three phosphatidylinositol-polyphosphate 5-phosphatase genes from *Saccharomyces cerevisiae* results in pleiotropic abnormalities of vacuole morphology, cell shape, and osmohomeostasis. *Eur. J. Cell Biol.*, **74**, 350-360.
- Stankewicz,C. and Rininsland,F.H. (2006). A robust screen for inhibitors and enhancers of phosphoinositide-3 kinase (PI3K) activities by ratiometric fluorescence superquenching. *J. Biomol. Screen.*, **11**, 413-422.
- Steelman,L.S., Chappell,W.H., Abrams,S.L., Kempf,R.C., Long,J., Laidler,P., Mijatovic,S., Maksimovic-Ivanic,D., Stivala,F., Mazzarino,M.C., Donia,M., Fagone,P., Malaponte,G., Nicoletti,F., Libra,M., Milella,M., Tafuri,A., Bonati,A., Basccke,J., Cocco,L., Evangelisti,C., Martelli,A.M., Montalto,G., Cervello,M., and McCubrey,J.A. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany. NY).*, **3**, 192-222.

- Stefan,C.J., Audhya,A., and Emr,S.D. (2002). The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 542-557.
- Stefan,C.J. and Blumer,K.J. (1999). A syntaxin homolog encoded by VAM3 mediates down-regulation of a yeast G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1835-1841.
- Stefan,C.J., Padilla,S.M., Audhya,A., and Emr,S.D. (2005). The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2910-2923.
- Stolz,L.E., Huynh,C.V., Thorner,J., and York,J.D. (1998a). Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (INP51, INP52 and INP53 gene products) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **148**, 1715-1729.
- Stolz,L.E., Kuo,W.J., Longchamps,J., Sekhon,M.K., and York,J.D. (1998b). INP51, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11852-11861.
- Straede,A. and Heinisch,J.J. (2007). Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett.*, **581**, 4495-4500.
- Strahl,T. and Thorner,J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**, 353-404.
- Su,L.J., Auluck,P.K., Outeiro,T.F., Yeger-Lotem,E., Kritzer,J.A., Tardiff,D.F., Strathearn,K.E., Liu,F., Cao,S., Hamamichi,S., Hill,K.J., Caldwell,K.A., Bell,G.W., Fraenkel,E., Cooper,A.A., Caldwell,G.A., McCaffery,J.M., Rochet,J.C., and Lindquist,S. (2010). Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Dis. Model. Mech.*, **3**, 194-208.
- Subramaniam,P.S., Whye,D.W., Efimenko,E., Chen,J., Tosello,V., De Keersmaecker,K., Kashishian,A., Thompson,M.A., Castillo,M., Cordon-Cardo,C., Dave,U.P., Ferrando,A., Lannutti,B.J., and Diacovo,T.G. (2012a). Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL. *Cancer Cell.*, **21**, 459-472.
- Suh,B.C. and Hille,B. (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu. Rev. Biophys.*, **37**:175-95, 175-195.
- Sun,M., Hart,J.R., Hillmann,P., Gymnopoulos,M., and Vogt,P.K. (2011). Addition of N-terminal peptide sequences activates the oncogenic and signaling potentials of the catalytic subunit p110alpha of phosphoinositide-3-kinase. *Cell Cycle.*, **10**, 3731-3739.

- Sun,Y., Carroll,S., Kaksonen,M., Toshima,J.Y., and Drubin,D.G. (2007). PtdIns(4,5)P₂ turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J. Cell Biol.*, **177**, 355-367.
- Sun,Y., Kaksonen,M., Madden,D.T., Schekman,R., and Drubin,D.G. (2005). Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P₂ is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol. Biol. Cell.*, **16**, 717-730.
- Suvorova,E.S., Duden,R., and Lupashin,V.V. (2002). The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *J. Cell Biol.*, **157**, 631-643.
- Schweinsberg, PD., Smith, RG., Loo, TL (1981). Identification of the metabolites of an antitumor tricyclic nucleoside (NSC-154020). *Biochem Pharmacol.* **30(18)**, 2521-6.
- Tabas-Madrid,D., Nogales-Cadenas,R., and Pascual-Montano,A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.*, **40**, W478-W483.
- Taguchi,T. (2013). Emerging roles of recycling endosomes. *J. Biochem.*, **153**, 505-510.
- Tahirovic,S., Schorr,M., Then,A., Berger,J., Schwarz,H., and Mayinger,P. (2003). Role for lipid signaling and the cell integrity MAP kinase cascade in yeast septum biogenesis. *Curr. Genet.*, **43**, 71-78.
- Tall,G.G., Hama,H., DeWald,D.B., and Horazdovsky,B.F. (1999). The phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein Vac1p interacts with a Rab GTPase and a Sec1p homologue to facilitate vesicle-mediated vacuolar protein sorting. *Mol. Biol. Cell.*, **10**, 1873-1889.
- Tardiff,D.F., Jui,N.T., Khurana,V., Tambe,M.A., Thompson,M.L., Chung,C.Y., Kamadurai,H.B., Kim,H.T., Lancaster,A.K., Caldwell,K.A., Caldwell,G.A., Rochet,J.C., Buchwald,S.L., and Lindquist,S. (2013). Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates alpha-synuclein toxicity in neurons. *Science.*, **342**, 979-983.
- Teis,D., Saksena,S., and Emr,S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell.*, **15**, 578-589.
- TerBush,D.R. and Novick,P. (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **130**, 299-312.
- Thapa,N. and Anderson,R.A. (2012). PIP₂ signaling, an integrator of cell polarity and vesicle trafficking in directionally migrating cells. *Cell Adh. Migr.*, **6**, 409-412.

- Tong,A.H., Lesage,G., Bader,G.D., Ding,H., Xu,H., Xin,X., Young,J., Berriz,G.F., Brost,R.L., Chang,M., Chen,Y., Cheng,X., Chua,G., Friesen,H., Goldberg,D.S., Haynes,J., Humphries,C., He,G., Hussein,S., Ke,L., Krogan,N., Li,Z., Levinson,J.N., Lu,H., Menard,P., Munyana,C., Parsons,A.B., Ryan,O., Tonikian,R., Roberts,T., Sdicu,A.M., Shapiro,J., Sheikh,B., Suter,B., Wong,S.L., Zhang,L.V., Zhu,H., Burd,C.G., Munro,S., Sander,C., Rine,J., Greenblatt,J., Peter,M., Bretscher,A., Bell,G., Roth,F.P., Brown,G.W., Andrews,B., Bussey,H., and Boone,C. (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science.*, **303**, 808-813.
- Torres,L., Martin,H., Garcia-Saez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sanchez,M., and Nombela,C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lyt2 mutants. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2845-2854.
- Treusch,S., Hamamichi,S., Goodman,J.L., Matlack,K.E., Chung,C.Y., Baru,V., Shulman,J.M., Parrado,A., Bevis,B.J., Valastyan,J.S., Han,H., Lindhagen-Persson,M., Reiman,E.M., Evans,D.A., Bennett,D.A., Olofsson,A., DeJager,P.L., Tanzi,R.E., Caldwell,K.A., Caldwell,G.A., and Lindquist,S. (2011). Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science.*, **334**, 1241-1245.
- Trotman,L.C., Wang,X., Alimonti,A., Chen,Z., Teruya-Feldstein,J., Yang,H., Pavletich,N.P., Carver,B.S., Cordon-Cardo,C., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Chi,S.G., Kim,H.J., Misteli,T., Jiang,X., and Pandolfi,P.P. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell.*, **128**, 141-156.
- Tugendreich,S., Perkins,E., Couto,J., Barthmaier,P., Sun,D., Tang,S., Tulac,S., Nguyen,A., Yeh,E., Mays,A., Wallace,E., Lila,T., Shivak,D., Prichard,M., Andrejka,L., Kim,R., and Melese,T. (2001). A streamlined process to phenotypically profile heterologous cDNAs in parallel using yeast cell-based assays. *Genome Res.*, **11**, 1899-1912.
- Tuveson,D.A. and Hingorani,S.R. (2005). Ductal pancreatic cancer in humans and mice. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **70:65-72.**, 65-72.
- Tzenaki,N. and Papakonstanti,E.A. (2013). p110delta PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. *Front Oncol.*, **3:40**, 40.
- Ullrich,O., Reinsch,S., Urbe,S., Zerial,M., and Parton,R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.*, **135**, 913-924.
- Urlick,M.E., Rudd,M.L., Godwin,A.K., Sgroi,D., Merino,M., and Bell,D.W. (2011). PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res.*, **71**, 4061-4067.
- Vadas,O., Burke,J.E., Zhang,X., Berndt,A., and Williams,R.L. (2011). Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci. Signal.*, **4**, re2.

- Vadlakonda,L., Pasupuleti,M., and Pallu,R. (2013). Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells. *Front Oncol.*, **3**:85, 85.
- Valdivia,R.H. (2004). Modeling the function of bacterial virulence factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.*, **3**, 827-834.
- Valdivia,R.H. and Schekman,R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10287-10292.
- Van Blitterswijk,W.J. and Verheij,M. (2013). Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1831**, 663-674.
- Vazquez,M., Nogales-Cadenas,R., Arroyo,J., Botias,P., Garcia,R., Carazo,J.M., Tirado,F., Pascual-Montano,A., and Carmona-Saez,P. (2010). MARQ: an online tool to mine GEO for experiments with similar or opposite gene expression signatures. *Nucleic Acids Res.*, **38**, W228-W232.
- Venkateswarlu,K., Brandom,K.G., and Lawrence,J.L. (2004). Centaurin-alpha1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6205-6208.
- Verna,J., Lodder,A., Lee,K., Vagts,A., and Ballester,R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 13804-13809.
- Vida,T.A. and Emr,S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.*, **128**, 779-792.
- Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., and de la Torre-Ruiz MA (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9149-9159.
- Vlahos,C.J., Matter,W.F., Hui,K.Y., and Brown,R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, **269**, 5241-5248.
- Vogel,J.L., Parsell,D.A., and Lindquist,S. (1995). Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Curr. Biol.*, **5**, 306-317.
- Von Zastrow,M. and Sorkin,A. (2007). Signaling on the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 436-445.
- Vucenik,I. and Stains,J.P. (2012). Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1271**:37-43, 37-43.
- Walch-Solimena,C. and Novick,P. (1999). The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 523-525.

- Walker,E.H., Pacold,M.E., Perisic,O., Stephens,L., Hawkins,P.T., Wymann,M.P., and Williams,R.L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell.*, **6**, 909-919.
- Wallin,J.J., Edgar,K.A., Guan,J., Berry,M., Prior,W.W., Lee,L., Lesnick,J.D., Lewis,C., Nonomiya,J., Pang,J., Salphati,L., Olivero,A.G., Sutherland,D.P., O'Brien,C., Spoerke,J.M., Patel,S., Lensun,L., Kassees,R., Ross,L., Lackner,M.R., Sampath,D., Belvin,M., and Friedman,L.S. (2011). GDC-0980 is a novel class I PI3K/mTOR kinase inhibitor with robust activity in cancer models driven by the PI3K pathway. *Mol. Cancer Ther.*, **10**, 2426-2436.
- Watanabe,M., Chen,C.Y., and Levin,D.E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16829-16836.
- Watanabe,Y., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5740-5749.
- Wee,S., Wiederschain,D., Maira,S.M., Loo,A., Miller,C., deBeaumont,R., Stegmeier,F., Yao,Y.M., and Lengauer,C. (2008). PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 13057-13062.
- Whyte,J.R. and Munro,S. (2001). The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev. Cell.*, **1**, 527-537.
- Wichmann,H., Hengst,L., and Gallwitz,D. (1992). Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). *Cell.*, **71**, 1131-1142.
- Wickner,W. (2010). Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a Rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26:115-36.**, 115-136.
- Wilk,S., Wittland,J., Thywissen,A., Schmitz,H.P., and Heinisch,J.J. (2010). A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness in vivo. *Mol. Genet. Genomics.*, **284**, 217-229.
- Winzeler,E.A., Shoemaker,D.D., Astromoff,A., Liang,H., Anderson,K., Andre,B., Bangham,R., Benito,R., Boeke,J.D., Bussey,H., Chu,A.M., Connelly,C., Davis,K., Dietrich,F., Dow,S.W., El Bakkoury,M., Foury,F., Friend,S.H., Gentalen,E., Giaever,G., Hegemann,J.H., Jones,T., Laub,M., Liao,H., Liebundguth,N., Lockhart,D.J., Lucau-Danila,A., Lussier,M., M'Rabet,N., Menard,P., Mittmann,M., Pai,C., Rebischung,C., Revuelta,J.L., Riles,L., Roberts,C.J., Ross-MacDonald,P., Scherens,B., Snyder,M., Sookhai-Mahadeo,S., Storms,R.K., Veronneau,S., Voet,M., Volckaert,G., Ward,T.R., Wysocki,R., Yen,G.S., Yu,K., Zimmermann,K., Philippsen,P., Johnston,M., and Davis,R.W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.*, **285**, 901-906.

- Wolfender, J.L. and Queiroz, E.F. (2012). New approaches for studying the chemical diversity of natural resources and the bioactivity of their constituents. *Chimia (Aarau.),* **66**, 324-329.
- Wolff, M., Haasen, D., Merk, S., Kroner, M., Maier, U., Bordel, S., Wiedenmann, J., Nienhaus, G.U., Valler, M., and Heilker, R. (2006). Automated high content screening for phosphoinositide 3 kinase inhibition using an AKT 1 redistribution assay. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.,* **9**, 339-350.
- Wu, H., Shekar, S.C., Flinn, R.J., El Sibai, M., Jaiswal, B.S., Sen, K.I., Janakiraman, V., Seshagiri, S., Gerfen, G.J., Girvin, M.E., and Backer, J.M. (2009). Regulation of Class IA PI 3-kinases: C2 domain-iSH2 domain contacts inhibit p85/p110alpha and are disrupted in oncogenic p85 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **106**, 20258-20263.
- Xie, Y., Abel, P.W., Kirui, J.K., Deng, C., Sharma, P., Wolff, D.W., Toews, M.L., and Tu, Y. (2013). Identification of upregulated phosphoinositide 3-kinase gamma as a target to suppress breast cancer cell migration and invasion. *Biochem. Pharmacol.,* **85**, 1454-1462.
- Xing, M. (2010). Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid.,* **20**, 697-706.
- Yaguchi, S., Fukui, Y., Koshimizu, I., Yoshimi, H., Matsuno, T., Gouda, H., Hirono, S., Yamazaki, K., and Yamori, T. (2006). Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.,* **98**, 545-556.
- Yakir-Tamang, L. and Gerst, J.E. (2009). A phosphatidylinositol-transfer protein and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase control Cdc42 to regulate the actin cytoskeleton and secretory pathway in yeast. *Mol. Biol. Cell.,* **20**, 3583-3597.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T., and Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.,* **125**, 1077-1093.
- Yan, Y. and Backer, J.M. (2007). Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochem. Soc. Trans.,* **35**, 239-241.
- Yeang, C.H., McCormick, F., and Levine, A. (2008). Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. *FASEB J.,* **22**, 2605-2622.
- Yoshida, S., Ohya, Y., Goebel, M., Nakano, A., and Anraku, Y. (1994a). A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.,* **269**, 1166-1172.
- Yoshida, S., Ohya, Y., Nakano, A., and Anraku, Y. (1994b). Genetic interactions among genes involved in the STT4-PKC1 pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.,* **242**, 631-640.

- Yost,H.J. and Lindquist,S. (1988). Translation of unspliced transcripts after heat shock. *Science.*, **242**, 1544-1548.
- Young,K., Jayasuriya,H., Ondeyka,J.G., Herath,K., Zhang,C., Kodali,S., Galgoci,A., Painter,R., Brown-Driver,V., Yamamoto,R., Silver,L.L., Zheng,Y., Ventura,J.I., Sigmund,J., Ha,S., Basilio,A., Vicente,F., Tormo,J.R., Pelaez,F., Youngman,P., Cully,D., Barrett,J.F., Schmatz,D., Singh,S.B., and Wang,J. (2006). Discovery of FabH/FabF inhibitors from natural products. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 519-526.
- Yu,I.M. and Hughson,F.M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26:137-56**, 137-156.
- Yu,J., Zhang,Y., McIlroy,J., Rordorf-Nikolic,T., Orr,G.A., and Backer,J.M. (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1379-1387.
- Yu,J.W., Mendrola,J.M., Audhya,A., Singh,S., Keleti,D., DeWald,D.B., Murray,D., Emr,S.D., and Lemmon,M.A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol. Cell.*, **13**, 677-688.
- Zabrocki,P., Bastiaens,I., Delay,C., Bammens,T., Ghillebert,R., Pellens,K., De Virgilio,C., Van Leuven,F., and Winderickx,J. (2008). Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1783**, 1767-1780.
- Zhang,J.H., Chung,T.D., and Oldenburg,K.R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.*, **4**, 67-73.
- Zhang,L., Yang,N., Katsaros,D., Huang,W., Park,J.W., Fracchioli,S., Vezzani,C., Rigault de la Longrais IA, Yao,W., Rubin,S.C., and Coukos,G. (2003). The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, **63**, 4225-4231.
- Zhang,X., Orlando,K., He,B., Xi,F., Zhang,J., Zajac,A., and Guo,W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J. Cell Biol.*, **180**, 145-158.
- Zhang,X.C., Piccini,A., Myers,M.P., Van Aelst,L., and Tonks,N.K. (2012). Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN. *Biochem. J.*, **444**, 457-464.
- Zhao,L. and Vogt,P.K. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 2652-2657.

- Zhao,Y., Sohn,J.H., and Warner,J.R. (2003). Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 699-707.
- Zhou,B.P., Liao,Y., Xia,W., Spohn,B., Lee,M.H., and Hung,M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 245-252.
- Zhu,Q., Youn,H., Tang,J., Tawfik,O., Dennis,K., Terranova,P.F., Du,J., Raynal,P., Thrasher,J.B., and Li,B. (2008). Phosphoinositide 3-OH kinase p85alpha and p110beta are essential for androgen receptor transactivation and tumor progression in prostate cancers. *Oncogene.*, **27**, 4569-4579.
- Zhu,W. and Nelson,C.M. (2012). PI3K signaling in the regulation of branching morphogenesis. *Biosystems.*, **109**, 403-411.
- Zoncu,R., Efeyan,A., and Sabatini,D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 21-35.
- Zunder,E.R., Knight,Z.A., Houseman,B.T., Apsel,B., and Shokat,K.M. (2008). Discovery of drug-resistant and drug-sensitizing mutations in the oncogenic PI3K isoform p110 alpha. *Cancer Cell.*, **14**, 180-192.